

UNTERSUCHUNGEN
ZUR THROMBOZYTENFUNKTION
BEI ESSENTIELLER THROMBOZYTÄMIE
UND REAKTIVER THROMBOZYTÖSE

Bettina Maria Baumann

Disbui. München

1988

Aus der Medizinischen Poliklinik der
Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Nepomuk Zöllner

UNTERSUCHUNGEN ZUR THROMBOZYTENFUNKTION
BEI ESSENTIELLER THROMBOZYTHÄMIE UND
REAKTIVER THROMBOZYTÖSE

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bettina Maria Baumann
aus
Tübingen
Jahr
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Hehlmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Duhm

Prof. Dr. E. Hiller

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. I. Hillmar, Dr. H. Piechowiak

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4.2.1988

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Hehlmann und Frau Dr. I. Hillmar im Labor der Klinischen Biochemie an der Medizinischen Poliklinik der Universität München von Januar 1985 bis August 1985.

Herrn Prof. Dr. Hehlmann danke ich für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung der Arbeit und Herrn Prof. Dr. Zöllner für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit möchte ich mich bei Frau Dr. Hillmar, Frau Dr. Jahn und Herrn Dr. Piechowiak und bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	Seite 1
1. Zur Thrombozytenfunktion.....	Seite 1
2. Zur essentiellen Thrombozythämie und reaktiven Thrombozytose.....	Seite 8
Beschreibung der untersuchten Personen.....	Seite 13
Liste der eingenommenen Medikamente und ihre Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion.....	Seite 27
Material und Methoden.....	Seite 33
1. In-vitro Aggregationen.....	Seite 33
1.1 Aggregationsauslösende Substanzen.....	Seite 33
1.2 Gewinnung von PRP und PFP.....	Seite 33
1.3 Untersuchung des Aggregationsverhaltens.....	Seite 34
1.4 Auswertung der Aggregationsversuche.....	Seite 34
2. Bestimmung der cAMP-Spiegel in Thrombozyten.....	Seite 36
2.1 Reagenzien.....	Seite 36
2.2 Untersuchungsmaterial.....	Seite 36
2.3 Durchführung des cAMP-Tests.....	Seite 37
3. Bestimmung der Plasmakonzentrationen von α_1 -saurem Glykoprotein und Fibrinogen.....	Seite 39

Ergebnisse.....	Seite 40
1. In-vitro Aggregationen.....	Seite 40
1.1 Aggregationen mit Adrenalin.....	Seite 40
1.2 Aggregationen mit ADP.....	Seite 46
1.3 Aggregationen mit Kollagen.....	Seite 51
1.4 Aggregationen mit PAF.....	Seite 56
1.5 Aggregationen mit Thrombin.....	Seite 61
1.6 Dosisabhängigkeit der Adrenalin- induzierten Aggregation.....	Seite 67
1.7 Aggregationsantwort von ET-Thrombozyten auf Adrenalin nach Vorinkubation mit Normal-PFP.....	Seite 74
1.8 Aggregationsverhalten eines ET-Patienten ohne und mit thrombozytenaggregations- hemmender Therapie.....	Seite 75
2. Basale cAMP-Spiegel in Thrombozyten.....	Seite 77
3. Plasmaproteine.....	Seite 81
3.1 Fibrinogenkonzentration im Plasma.....	Seite 81
3.2 Plasmakonzentration des alpha ₁ - sauren Glykoproteins.....	Seite 86
Diskussion.....	Seite 91
Zusammenfassung.....	Seite 103
Literaturverzeichnis.....	Seite 105

Abkürzungsverzeichnis

ADP:	Adenosin-5'-diphosphat
BSA:	Serumalbumin vom Rind
cAMP:	zyklisches Adenosin-3,5'-monophosphat
CML:	Chronische myeloische Leukämie
E.C.:	Enzyme Commission (Number)
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
ET:	Essentielle Thrombozythämie
Hb:	Hämoglobin
12-HETE:	12-Hydroxy- 5,8,10,14 -eicosatetraensäure
12-HPETE:	12-Hydroperoxy- 5,8,10,14 -eicosatetraensäure
IBMX:	Isobutyl-methyl-xanthin
PAF:	Plättchen aktivierender Faktor
PAT:	Plättchenaggregationstest nach Breddin
PFP:	Plättchenfreies Plasma
PGE ₁ :	Prostaglandin E ₁
PGG ₂ :	Prostaglandin G ₂
PGH ₂ :	Prostaglandin H ₂
PGJ ₂ :	Prostaglandin J ₂
PRP:	Plättchenreiches Plasma
PV:	Polycythaemia Vera
RF:	Rheumafaktor
RT:	Reaktive Thrombozytose
TCA:	Trichloracetat
TIA:	Transitorische ischämische Attacke

Einleitung

1. Zur Thrombozytenfunktion

Thrombozyten sind von entscheidender Bedeutung für die primäre, noch reversible Hämostase, die durch Vasokonstriktion und den mechanischen Verschuß kleiner Gefäße mit einem Thrombozytenpfropf bewirkt wird. Sie haben allerdings auch Einfluß auf die sekundäre Hämostase, indem sie durch Freisetzung thrombozytärer Gerinnungsfaktoren zur Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems beitragen (Schneider & Scharf, 1985).

Einer der ersten Schritte des Hämostasemechanismus besteht in der Adhäsion der zirkulierenden Thrombozyten an freigelegte subendotheliale Strukturen wie Kollagen, Basalmembran und Mikrofibrillen; sie kommt durch Vermittlung des Glykoproteins IB der Thrombozytenmembran und des Faktors VIII/v. Willebrandfaktor (einem essentiellen Cofaktor) zustande (Schneider & Scharf, 1985).

Die Reaktion der Thrombozyten mit der subendothelialen Gewebsschicht führt durch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Agonisten und spezifischen Rezeptoren der Thrombozytenmembran zur Aktivierung der Thrombozyten (Vermynen et al., 1983). Diese Aktivierung äußert sich in Formveränderung, sogenannten Freisetzungsreaktionen und Aggregation der Thrombozyten. Als intrazelluläre Vermittlersubstanzen fungieren wie in vielen anderen Zellen Calcium-Ionen und zyklisches AMP. Ein Anstieg der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration fördert diese Vorgänge, wogegen eine Zunahme des intrathrombozytären cAMP-Gehaltes hemmend wirkt. Die in der Thrombozytenmembran lokalisierte Adenylat-Zyklase ist entscheidend an der Steuerung der intrazellulären Mediator-Konzentrationen beteiligt. Sie wird durch Calcium-Ionen, ADP und alpha-adrenerge Substanzen direkt in ihrer Aktivität gehemmt; eine indirekte Hemmung wird durch zyklische Endoperoxide und



deren Derivat Thromboxan A₂ bewirkt, die die PGE₁- und PGJ₂-vermittelte Stimulation der cAMP-Synthese unterbinden.

Die Formveränderung der Thrombozyten bewirkt eine neue Anordnung der Membranproteine und -glykoproteine, so daß Bindungsstellen für Fibrinogen und Fibrin freigelegt werden.

Eine weitere Folge der Thrombozytenaktivierung stellen die sogenannten Freisetzungsreaktionen dar:

- Aus Phospholipiden der Thrombozytenmembran wird durch die Phospholipase A₂ Arachidonsäure freigesetzt, die als Substrat für die Lipoxxygenase und Cyclooxygenase dient.

Die Lipoxxygenase katalysiert die Bildung instabiler Hydroperoxide z.B. 12-HPETE, die entweder zu stabilen Hydroxiden z.B. 12-HETE abgebaut oder zu anderen Substanzen wie Leukotrienen transformiert werden (Vermynen et al., 1983).

Die Cyclooxygenase ist an der Bildung instabiler Prostaglandin-Endoperoxide wie PGG₂ und dessen Derivat PGH₂ beteiligt; PGH₂ wird anschließend in verschiedene Prostaglandine und vor allem das physiologisch wichtige, instabile Thromboxan A₂ umgewandelt, das eine starke aggregationsfördernde und vasokonstriktorische Wirkung hat (Hamberg et al., 1975).

- Die Sekretionsreaktionen der zytoplasmatischen Granula erfolgt durch Verschmelzung mit Membranen, die Verbindung zum extrazellulären Raum haben; diese müssen zuvor in ihrer Struktur aufgelockert werden. Vermutlich geschieht das über die Aktivierung einer Calcium-abhängigen Phospholipase (Skaer, 1981). Die Freisetzung von Substanzen aus alpha-Granula wird durch geringere Mengen von Stimuli induziert als die Sekretion der Inhaltsstoffe von delta-Granula (Vermynen et al., 1983).

Die alpha-Granula speichern Proteine, die teilweise thrombozytenspezifisch sind, wie z.B. der Thrombozytenfaktor 4 -er entspricht der heparinneutralisierenden Aktivität der Thrombozyten -, beta-Thromboglobulin und einzelne Gerinnungsfaktoren, wie z.B. thrombozytäres Fibrinogen, Faktor VIII/von Willebrand-Faktor und Faktor V. Außerdem sind in den alpha-Granula kationische Peptide mit mitogenen, bakteriziden,

chemotaktischen und vasoaktiven Eigenschaften, sowie Glykoproteine wie Fibronektin und Thrombospondin gespeichert (Rao & Walsh, 1983).

Die delta-Granula enthalten Nucleotide wie ATP und ADP, sowie Serotonin, Calcium und Histamin in hoher Konzentration, außerdem geringe Mengen von Katecholaminen. Serotonin selbst hat eine geringe aggregationsfördernde Wirkung, wirkt jedoch vor allem potenzierend auf die von anderen Substanzen ausgelöste Aggregationsantwort und vermindert durch seine vasokonstriktorische Wirkung den Blutverlust aus dem verletzten Gefäß. ADP wird in Mengen freigesetzt, die ausreichen, um eine Aggregation auszulösen. Die Sekretionsreaktion der delta-Granula wird daher als wichtiger positiver feedback-Mechanismus angesehen, der die Größenzunahme des Thrombozytenpfropfes unterstützt.

Wird die Sekretionsreaktion der delta-Granula - z.B. durch Cyclooxygenasehemmer - unterbunden, so kann zwar in der sogenannten primären Phase der Aggregation vorübergehend eine Aggregationsreaktion der Thrombozyten auftreten, die weitere Vergrößerung und irreversible Verfestigung des Thrombus, die als sekundäre Phase der Aggregation bezeichnet und durch die Freisetzung von intrathrombozytärem ADP induziert, bzw. davon begleitet wird, bleibt jedoch aus und das Aggregat löst sich wieder auf (Marcus, 1982).

Durch eine Zunahme des thrombozytären cAMP-Gehalts und daraus resultierend einer Abnahme der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration werden die Freisetzungsreaktionen stark abgeschwächt. Völlig aufgehoben werden sie, wenn in Anwesenheit von Cyclooxygenase-Hemmern schwache Thrombozyten-Aktivatoren wie ADP, Adrenalin, Kollagen oder geringe Konzentrationen von Thrombin einwirken. Höhere Konzentrationen von Thrombin können trotz blockierter Cyclooxygenase normale Sekretionsreaktionen auslösen (Kaplan et al., 1979). Die einfachste Erklärung für dieses Phänomen ist, daß für die Sekretionsreaktionen höhere Calcium-Spiegel benötigt werden als für die primäre Thrombozytenaggregation, und daß ADP,

Adrenalin und Kollagen nur zusammen mit Thromboxan A₂ eine für Sekretion und sekundäre Aggregation ausreichende Calcium-Menge mobilisieren können, während unter Thrombineinfluß auch unabhängig von Thromboxan A₂ soviel Calcium bereitgestellt wird, daß es zur Induktion der Sekretionsreaktion und damit der sekundären Phase der Aggregation ausreicht (Vermylen et al.,1983).

Als dritte wichtige Thrombozytenreaktion auf aktivierende Stimuli ist die Aggregation zu nennen; sie kommt nach Ablauf komplexer Stoffwechselvorgänge durch eine anfangs reversible, später irreversible Bindung von Fibrinogen thrombozytärer und plasmatischer Herkunft an oben erwähnte spezifische Rezeptoren zustande (Peerschke,1982). Die divalente Struktur des Fibrinogenmoleküls ermöglicht eine Brückenbildung zwischen benachbarten Thrombozyten; sie wird von vielen Autoren als gemeinsame Endstrecke der verschiedenen Stoffwechselkaskaden gesehen, die zur Thrombozytenaggregation führen (Collier, 1980). Es existieren mindestens drei unterschiedliche Mechanismen, die zur Thrombozytenaggregation führen (Kinlough-Rathbone,1977):der erste wird durch das aus delta-Granula freigesetzte ADP im Sinne einer positiven Rückkopplung unterhalten, am zweiten sind als Mediatoren Prostaglandinendoperoxide und Thromboxan A₂ beteiligt. Ein dritter wurde aufgrund der Tatsache postuliert, daß mittels Calcium-Ionophoren oder hohen Thrombin-Konzentrationen auch dann Aggregationen ausgelöst werden können, wenn sowohl der ADP-, als auch der Arachidonsäure-abhängige Mechanismus blockiert worden ist.

PAF (platelet activating factor) wird derzeit als mögliche Mediatorsubstanz für diesen vermuteten dritten Mechanismus angesehen (Chignard et al.,1979), da es unabhängig von ADP- und Arachidonsäurestoffwechsel Aggregationen auslösen kann (Cazenare et al.,1979).

Die Interaktion zwischen den Fibrinrezeptoren an der Thrombozytenoberfläche und dem Fibrinnetz, das später bei der sekundären Hämostase entsteht, bewirkt eine weitere, irrever-

sible Verfestigung des Thrombozytenpfropfes (Vermeylen, 1983).

Störungen der beschriebenen Thrombozytenfunktionen können angeboren sein, sind allerdings in den meisten Fällen erworben. Sie können bei zahlreichen Erkrankungen wie z.B. Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, Leberkrankheiten, Tumoren, disseminierter intravasaler Gerinnung, Leukämien, sowie unter der Therapie mit ganz unterschiedlichen Medikamenten auftreten. Die Störung kann auf einzelne Plättchenfunktionen beschränkt sein, es können aber auch mehrere Funktionsabläufe betroffen sein:

- eine beeinträchtigte Thrombozytenadhäsion findet sich beim erworbenen von Willebrand-Syndrom und bei der Urämie.
- eine Abschwächung der Thrombozytenaggregation ist oft bei Urämie, myeloproliferativen Erkrankungen und Medikamenteneinflüssen nachweisbar. Vasodilatoren wie Theophyllin und Dipyridamol bewirken z.B. über eine Hemmung der Phosphodiesterase einen Anstieg des cAMP-Spiegels in den Thrombozyten, was sich hemmend auf das Aggregationsverhalten auswirkt. Die membranstabilisierende Wirkung mancher Medikamente äußert sich bei in vitro Aggregationen in der Reduktion der kollageninduzierten Aggregationsantwort, bzw. dem Fehlen der sekundären Phase der Aggregation auf ADP oder Adrenalin; einige typische Vertreter dieser Gruppe sind tricyclische Antidepressiva, Antihistaminika und Lokalanästhetika (Marcus 1982). Über eine negative Beeinflussung der Sekretionsreaktionen (siehe unten und S.95) führen viele entzündungshemmende Medikamente zur Abschwächung der Aggregationsantwort in vitro.
- erworbene Speicherdefekte und in der Folge Störungen der Sekretionsreaktion treten bei disseminierter intravasaler Gerinnung mit teilweise degranulierten, jedoch rezirkulierenden Thrombozyten, bei Immunthrombozytopathien, bei akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen, unter chronischer Hämodialysebehandlung oder bei Transfusion konservierter Blutplättchen auf.

- ebenfalls zu Störungen der Sekretionsreaktion führen Defekte des Prostaglandin-Stoffwechsels, die vor allem auf medikamentöse Beeinflussung zurückzuführen sind: Acetylsalicylat-haltige Medikamente hemmen die Cyclooxygenase, Imidazol-Abkömmlinge die Thromboxan-Synthetase, Indometacin-Derivate und Kortikosteroide die Phospholipase-Aktivität.

- eine Herabsetzung der gerinnungsstimulierenden Aktivität der Thrombozyten, d.h. eine verminderte PF3-Aktivität ist bei Urämie und myeloproliferativen Erkrankungen nachweisbar.

- eine verminderte Rezeptorverfügbarkeit an der Thrombozytenmembran findet sich besonders bei myeloproliferativen Erkrankungen.

- neben den oben erwähnten Beispielen für Hämostasestörungen stellt die Thromboseneigung bei myeloproliferativen Erkrankungen und soliden Tumoren eine weitere wichtige Funktionsstörung der Thrombozyten dar.

Die Beispiele zeigen die Vielfalt möglicher Defekte bei derselben Krankheit (Schneider & Scharf, 1985).

Die genaue Lokalisation der Störung ist in vielen Fällen mit verschiedenen Tests der Thrombozytenfunktion möglich und erlaubt eine differenzierte Einteilung der Thrombozytopathien. Folgende Testmethoden zur Funktionsdiagnostik der Thrombozyten werden häufig angewandt (Scharrer, 1985):

- Zählung der Thrombozyten
- Bestimmung der Blutungszeit
- Messung der Größenverteilung der Thrombozyten
- Beobachtung der Thrombozytenausbreitung auf blutfremden Oberflächen
- Mikroskopische Beurteilung des Thrombozytenformwandels
- Bestimmung der Thrombozytenadhäsivität
- Aggregationsuntersuchungen
- Messung der Thrombozytenüberlebenszeit
- Untersuchung der Thrombozytenmembran, bzw. Identifizierung einzelner Membranbestandteile
- Bestimmung des ATP und ADP im Thrombozyten

Die Beurteilung des Funktionsverhaltens menschlicher Blut-

plättchen wird durch die Heterogenität der zirkulierenden Thrombozytenpopulationen erheblich erschwert; diese Heterogenität ist bereits bei gesunden Probanden im Vergleich zu anderen Zellsystemen sehr ausgeprägt und wird durch die Abhängigkeit der Thrombozytenfunktion vom Alter des jeweiligen Thrombozyten, durch Abgabe der Plättchenpopulationen aus Megakaryozyten unterschiedlichen Polyploidiegrades und durch Rezirkulation partiell degranulierter Thrombozyten nach Stimulation bestimmt (Schneider & Scharf, 1985).

Die Verhältnisse werden noch weiter kompliziert, wenn man berücksichtigt, daß bei den häufig vorkommenden Defekten der Plättchenfunktion bei myeloproliferativen Erkrankungen neben den normalen, aus einem System unterschiedlich polyploider Megakaryozyten stammenden zirkulierenden Plättchenpopulationen, zusätzlich eine atypische Thrombozytenpopulation vorliegt, die aus einem maligne entarteten, autonom proliferierenden Zellklon stammt (Fialkow et al., 1981).

2. Zur Essentiellen Thrombozythämie und Reaktiven Thrombozytose

Eine Erhöhung der Thrombozytenzahlen ist ein häufiger klinischer Befund, der bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern auftritt.

Sogenannte reaktive Thrombozytosen finden sich als Begleitsymptom bei so unterschiedlichen Grunderkrankungen wie Malignomen, Kollagenosen, Infektionen und chronischen Entzündungen, sowie nach Operationen -vor allem Splenektomien- und nach Blutverlusten.

Auch bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems kann es zu einer Thrombozytose kommen.

Die essentielle Thrombozythämie wurde erstmals 1934 unter der Bezeichnung Häorrhagische Thrombozythämie in der Literatur beschrieben (Epstein & Goedel, 1934); sie gehört zur Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen und betrifft hauptsächlich die megakaryozytäre Zellreihe. Anfangs wurde diskutiert, ob die essentielle Thrombozythämie ein eigenständiges Krankheitsbild darstellt, oder lediglich als frühe Phase einer anderen myeloproliferativen Erkrankung anzusehen ist (Hartwich et al., 1975), und es finden sich in der Literatur Berichte, daß während eines längeren Beobachtungszeitraums einzelne Fälle von essentieller Thrombozythämie in andere Krankheitsbilder des myeloproliferativen Formenkreises übergehen können (Silverstein, 1968; Singh & Wetherley-Mein, 1977). Mittlerweile ist sie jedoch als eigenständiges Krankheitsbild anerkannt, da die Mehrzahl der ET-Fälle keinen Übergang in andere myeloproliferative Krankheitsbilder zeigt. Auch findet sich bei der essentiellen Thrombozythämie eine charakteristische Symptomatik, die z.B. für eine Polycythaemia Vera in dieser Form nicht typisch ist (Jahn, 1987). Bei der essentiellen Thrombozythämie findet sich neben der charakteristischen Erhöhung der Thrombozytenzahl auch ein verändertes Plättchenverhalten (Ginsburg, 1975); beides führt

entweder zu thrombembolischen und/oder hämorrhagischen Komplikationen (Wu,1978). Es gibt Hinweise darauf, daß ET-Patienten mit relativ niedrigen Thrombozytenwerten eher thrombembolische Komplikationen entwickeln, während bei Patienten mit relativ hohen Thrombozytenzahlen hämorrhagische Symptome vorherrschend zu sein scheinen (Preston et al.,1974; Bellucci et al.,1986).

Die klinische Symptomatik der ET kann recht vielgestaltig sein: während manche ET-Patienten über längere Zeiträume asymptomatisch sind (Hoagland & Silverstein,1978), neigen andere zu rezidivierendem Nasenbluten, zeigen ätiologisch ungeklärte gastrointestinale Blutungen und postoperative Hämorrhagien (Silverstein,1968).

Charakteristisch sind auch Mikrozirkulationsstörungen der Extremitäten (Singh & Wetherley-Mein,1977) und des ZNS (Levine & Swansson,1968), die sich durch brennende Schmerzen in Füßen Händen und Fingern, bisweilen in Verbindung mit Blässe, Erythem und Zyanose, bzw. neurologische Symptome wie Parästhesien, Kopfschmerzen, transitorische ischämische Attacken manifestieren (Jabaily et al.,1983). Auch über koronare Durchblutungsstörungen (Virmani et al.,1979) und arterielle Thrombosen größerer Gefäße (Hussain et al.,1978) wurde berichtet.

Die Diagnose der essentiellen Thrombozythämie stellt im Prinzip eine Ausschlußdiagnose bei erhöhten Thrombozytenwerten dar und es wurden zur genauen Abgrenzung, bzw. zu Studienzwecken strenge diagnostische Kriterien erarbeitet (Murphy et al.,1986), die im wesentlichen auf klinischen Befunden beruhen; denn die eindeutige Abgrenzung durch Untersuchung der Thrombozyten mit biochemischen Methoden ist derzeit noch nicht möglich (Ginsburg,1975; Pareti et al.,1982; Yamamoto et al.,1984). Hierbei werden folgende Tatbestände für die Diagnose einer ET gefordert:

- eine Thrombozytenzahl über 600 000/ μ l; früher wurde vielfach eine Anzahl von 1 Mio Thrombozyten/ μ l als Grenzwert postuliert. Da durch die Forderung einer so hohen Mindest-

thrombozytenzahl die Diagnose einer ET zum Nachteil der Patienten unter Umständen nicht gestellt wird, hat man in jüngster Zeit diesen Grenzwert herabgesetzt und fordert jetzt nur noch eine persistierende Thrombozytose mit einer Thrombozytenzahl $\geq 450.000/\mu\text{l}$ über mehr als 6 Wochen (Pres ton, 1982; Hehlmann et al., 1988)

- Ausschluß einer reaktiven Thrombozytose
- normaler Hämatokrit oder Hämoglobinwert unter 13g/dl (zum Ausschluß einer PV)
- normale Eisenspeicher im Knochenmark; bei leeren Eisenspeichern infolge von okkulten Blutverlusten sollten die Speicher aufgefüllt werden können, ohne zwangsläufig einen Anstieg des Hämatokrits zu bewirken. Auch dieses Kriterium dient zur Abgrenzung gegenüber der PV, wo in über 90% der Fälle das Speichereisen im Knochenmark fehlt und eine Substitutionstherapie immer einen Anstieg des Hämoglobins um mehr als 1g/dl zur Folge hat (Murphy et al., 1986).
- keine Vermehrung der kollagenen Fasern in der Knochenmarksbiopsie (im Gegensatz zur Osteomyelofibrose)
- kein Nachweis eines Philadelphia-Chromosoms (zum Ausschluß einer chronisch myeloischen Leukämie)

Vor allem die klare Abgrenzung der ET zur PV bereitet häufig Schwierigkeiten, da der klinische Verlauf und die Knochenmarkshistologie beider Erkrankungen sehr ähnlich sein kann: Die Zunahme der Thrombozytopoese, die bei der ET immer gegeben ist, stellt auch einen häufigen Befund bei der PV dar; diese Zunahme muß sich allerdings nicht in vollem Ausmaß in der Thrombozytenzahl des peripheren Blutes manifestieren, da gleichzeitig eine mäßige Verkürzung der Thrombozytenüberlebensdauer bestehen kann und bei Vorhandensein einer Splenomegalie - dies ist bei 70% der PV-Patienten und bei 30% der ET-Patienten der Fall - ein erhöhter Anteil des Thrombozytenbestandes dort gespeichert wird (Murphy, 1983). Knochenmarksbiopsien bei ET weisen neben der charakteristischen Hyperplasie der Megakaryozyten die Anordnung von Throm-

bozyten in größeren Gruppen und atypische Megakaryozyten auf (Hussain et al., 1978); wie bei der PV können auch Knochenmarkszellen aus der granulozytären oder erythrozytären Reihe vermehrt sein (Silverstein, 1977). Die gesteigerte Leukozytopoese drückt sich sowohl bei der ET als auch bei der PV in 40% der Fälle in einer Leukozytose mit Werten über 12.000/ μ l im peripheren Blut und manchmal in einer Hyperzellularität des Knochenmarks aus (Murphy, 1983).

Die anfänglich strenge Definition der ET, die auch heute noch von vielen Autoren vertreten wird verlangte Thrombozytenwerte von mehr als einer Million/ μ l; sie erwies sich als nützlich zur Abgrenzung gegenüber den wesentlich zahlreicheren reaktiven Thrombozytosen, bei denen meist eine weniger ausgeprägte Erhöhung der Thrombozytenzahlen vorliegt. Doch bei einer so hohen Mindestthrombozytenzahl bleiben viele Fälle von essentieller Thrombozythämie mit ihrem erhöhten Risiko für Gefäßverschlüsse und Blutungen undiagnostiziert. Dies kann unter Umständen erhebliche Nachteile für die betroffenen Patienten haben (Hehlmann et al., 1987; Jahn, 1987). Nimmt man dagegen als Diagnosekriterium eine Thrombozytenzahl von 600.000/ μ l (Murphy et al., 1986) oder lediglich eine persistierende Thrombozytose (Hehlmann et al., 1988) an, werden zwar auch ET-Patienten mit niedrigeren Thrombozytenzahlen erfaßt, aber gleichzeitig wird die Abgrenzung zur reaktiven Thrombozytose schwieriger. Daraus und aus der Tatsache, daß aufgrund der Plättchenfunktionsstörungen bei essentieller Thrombozythämie Symptome sogar zu einem Zeitpunkt auftreten können, zu dem die Thrombozytenwerte noch im Normbereich liegen (Valle et al., 1985), ergibt sich die Notwendigkeit, anhand weiterer Diagnosekriterien unabhängig von willkürlich festgelegten Thrombozytenmindestzahlen auch diejenigen ET-Patienten erfassen zu können, deren Thrombozytenerhöhung weniger ausgeprägt ist als bisher gefordert wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb, Thrombozyten von Patienten mit essentieller Thrombozythämie durch geeignete

in-vitro Methoden charakterisiert und in ihren Eigenschaften mit denen gesunder Normalpersonen, bzw. Patienten mit reaktiver Thrombozytose - eventuell auch Patienten mit anderen myeloproliferativen Erkrankungen - verglichen werden; im Vordergrund standen hierbei Untersuchungen des Aggregationsverhaltens, wie sie zum Teil auch schon von anderen Autoren bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie und anderen myeloproliferativen Erkrankungen angewandt worden waren (Hussain et al., 1978; Schafer, 1984).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zusätzliche Kriterien zu prüfen, die unabhängig von der Thrombozytenzahl zur Diagnose einer ET beitragen können. Weiterhin sollte versucht werden, eventuell auf zellulärer Ebene Aussagen zu den Ursachen der bunten klinischen Symptomatik der ET zu gewinnen; in diesem Zusammenhang wird nachfolgend erstmals über die Bestimmung intrathrombozytärer cAMP-Spiegel und der Plasmakonzentration des α_1 -sauren Glykoproteins bei ET-Patienten, sowie den Einfluß von PAF auf das Aggregationsverhalten von ET-Thrombozyten berichtet.

Patienten und Kontrollpersonen

Jede Person, deren Blut untersucht wurde, erhielt eine Nummer, unter der sie in allen Darstellungen aufgeführt ist; allerdings konnten nicht immer alle Untersuchungen am Blut einer Person durchgeführt werden, da die Ausbeute an plättchenreichem Plasma recht unterschiedlich war.

In manchen Fällen verließ die Aggregationskurve nach kurzer Zeit den Meßbereich und konnte somit nicht quantitativ ausgewertet werden. Aggregationen, bei denen ein Aggregans in einer anderen als der sonst verwendeten Konzentration eingesetzt wurde, gingen ebenfalls nicht in die statistische Auswertung ein.

1. Gesunde Normalpersonen - ohne thrombozytenaggregationshemmende Medikamente (Personen Nr.1-17)

Es handelte sich um gesunde Probanden beiderlei Geschlechts im Alter zwischen 20 und 55 Jahren, die mindestens 5 Tage vor der Blutabnahme keine thrombozytenaggregationshemmenden Medikamente eingenommen hatten. Die Werte des kleinen Blutbildes und die Thrombozytenzahlen bewegten sich im Normbereich.

2. Patienten mit ET - derzeit ohne thrombozytenaggregationshemmende Therapie (Personen Nr.18-24)

Diese Gruppe besteht aus 7 Patienten mit essentieller Thrombozythämie, die in den Jahren 1979 bis 1985 an der Medizinischen Poliklinik der Universität München diagnostiziert wurde. Die vorherrschende Symptomatik bei Diagnosestellung waren periphere und zerebrale Mikrozirkulationsstörungen, bzw.thrombembolische Komplikationen. Bei Patient Nr.23 wurde die essentielle Thrombozythämie zufällig bei einem Klinikaufenthalt wegen einer Infektionserkrankung entdeckt; er war auch in den Jahren nach der Diagnosestellung asymptomatisch.

Da sich die Thrombozytenzahlen teilweise (bei Patient Nr.19-21) nach einer myelosuppressiven Therapie wieder im Normbereich befanden und Beschwerdefreiheit bestand, hämorrhagische Komplikationen aufgetreten waren (bei Patient Nr.18 und 24) oder trotz erhöhter Thrombozytenwerte keine ET-bedingten Symptome vorlagen, hatten diese Patienten in den Wochen vor der Blutabnahme keine Thrombozytenaggregationshemmer eingenommen. Genauere Informationen zu den einzelnen Patienten enthält Tabelle 1, Seite 16 und 17. Außer den dort aufgeführten Laborwerten wurden jeweils noch die Serumkonzentrationen von Natrium und Calcium, sowie die Blutungszeit und der Quick-Wert bestimmt; alle diese Werte bewegten sich im Normbereich.

3. Patienten mit reaktiver Thrombozytose - derzeit ohne thrombozytenaggregationshemmende Therapie (Personen Nr. 25-28)

Bei dieser Gruppe handelt es sich um 4 Patienten, die im Zeitraum zwischen März und Mai 1985 in der Medizinischen Poliklinik der Universität München stationär behandelt wurden und im Rahmen unterschiedlicher Grunderkrankungen (siehe Einleitung) erhöhte Thrombozytenzahlen aufwiesen. In Tabelle 2, Seite 18 finden sich nähere Informationen zu den einzelnen Patienten. Neben den dort aufgeführten Blutwerten wurden auch Quick-Wert und die Serumkonzentrationen von Natrium und Calcium bestimmt; sie befanden sich alle im Normbereich.

Es folgt nun ein Abkürzungsverzeichnis für die Tabellen 1-5:

m = männlich, w = weiblich, KHK = koronare Herzkrankheit,
AVK = arterielle Verschlusskrankheit, Hb = Hämoglobin
ET = vereinbar mit der Diagnose einer essentiellen Thrombo-
zythämie, ET/RT = vereinbar mit der Diagnose einer essentiellen
Thrombozythämie, differentialdiagnostisch kommt eine
reaktive Thrombozytose in Betracht, RT = vereinbar mit der
Diagnose einer reaktiven Thrombozytose, MM = megakaryozytäre
Myelose, CMGM = chronische megakaryogranulozytäre Myelose,
PV = Polycythaemia Vera, CMPE = chronisch myeloproliferative
Erkrankung, N = Normalbefund, n.d. = nicht durchgeführt,
k.A. = keine Angaben, + = vermehrt, erhöht bzw. vergrößert,
- = vermindert, verringert bzw. verkleinert
AH = Aggregationshemmer, MS = Myelosuppressive Therapie, ASS
= Acetylsalicylsäure

Tab. 1: ET-Patienten - derzeit ohne thrombozytenaggregations-
hemmende Therapie

Patient Nr.	18	19	20	21
Alter/Geschlecht	63/m	71/m	73/w	57/m
Diagnose (seit)	ET (1/85)	ET (9/81)	ET (9/82)	ET/PV (8/79)
Symptomatik bei Diagnose	Mesenterial- arterien- Pfortaderver- schluß; Milzvenenthrom- bose; Gastroin- testinalblutung	AVK, peri- phere Mikro- zirkulations- störungen	periphere Mikrozirkula- tionsstörungen	KHK; peri- phere Mikro- zirkula- tionsstörun- gen
Thrombozyten $\times 10^9/l$	692 - 978 aktuell: 619	300 - 1374 aktuell: 290	662 - 1548 aktuell: 295	23 - 1220 aktuell: 247
Leukozyten $\times 10^9/l$	13.1	14.5	3.2	6.3
Hb / g/dl /	14.4	15.4	12.1	17.0
Hb _E / pg /	28.3	26.1	28.5	35.9
Knochenmark:				
Megakaryopoese	+	+	+	+
Megakaryozyten in Gruppen	+	+	k.A.	+
Granulopoese	+	N	N	+
Erythropoese	N	N	N	+
Eisenspeicher	N	N	k.A.	leer
Zytol. Diagnose	ET/RT	n.d.	ET	ET
Histol. Diagnose	MM	MM	n.d.	MM
Splenomegalie	+	+	N	N
Bisherige Therapie der ET: AH/MS	AH	AH/MS	AH/MS	AH/MS Aderlässe
Begleiter- krankungen	-	-	-	-
Medikamente zum Zeitpunkt der Blutabnahme	Cimetidin; Pirenzepin; Aluminium- hydroxyd + Mag- nesiumhydroxyd	-	-	Salbutamol; Methyldigoxin; Theophyllin + Etafedrin + Doxylamin- succinat

Tab. 1: ET - Patienten - derzeit ohne thrombozytenaggregations-
hemmende Therapie (Fortsetzung)

Patient Nr.	22	23	24
Alter/Geschlecht	56/m	36/m	47/m
Diagnose (seit)	ET (1/83)	ET (1/84)	ET (5/85)
Symptomatik bei Diagnose	AVK; periphere Mikrozirkula- tionsstörungen	Carotisstenose	cerebrale Mikro- zirkulations- störung; Depres- sion mit org. Psychosyndrom; re- zidivierend Epista- xis; Urogenital- Blutung; Epilepsie; Apoplex
Thrombozyten $\times 10^9/l$	432 - 1794 aktuell: 397	532 - 571 aktuell: 565	725 - 970 aktuell: 725
Leukozyten $\times 10^9/l$	9.3	6.5	7.2
Hb / g/dl /	15.4	17.3	9.4
Hb _E / pg /	33.4	31.8	30.4
Knochenmark:			
Megakaryopoese	+	n.d.	-
Megakaryozyten in Gruppen	k.A.	n.d.	+
Granulopoese	+	n.d.	-
Erythropoese	-	n.d.	-
Eisenspeicher	N	n.d.	leer
zytol. Diagnose	n.d.	n.d.	n.d.
Histol. Diagnose	CMGM	n.d.	MM
Splenomegalie	N	+	N
Bisherige Therapie			
der ET: AH/MS	AH	-	AH
Begleiterkrankungen	Mastozytose	-	-
Medikamente zum Zeitpunkt der Blut- abnahme	-	-	Daxycyclin; Eisen-II-Sulfat

Tab. 2: Patienten mit RT - derzeit ohne thrombozytenaggregations-
hemmende Therapie

Patient Nr.	25	26	27	28
Alter/Geschlecht	50/m	76/m	72/m	79/w
Diagnose	RT bei Z.n. Splenektomie	RT als para- neoplasti- sches Syndrom bei Bronchial- Ca	RT nach Hemi- colectomie wegen Colon- Ca	RT bei akuter Pyelonephri- tis
Thrombozyten $\times 10^9/l$	722	637	428	451
Leukozyten $\times 10^9/l$	10.2	9.6	5.1	6.2
Hb / g/dl /	13.1	12.2	11.1	9.4
Hb _E / pg /	28.0	33.9	29.5	29.5
Knochenmarks- befund	-	gesteigerte Megakaryopoese; Granulopoese, Erythropoese, Eisenspeicher normal, evtl. mit megakaryozy- tärer Myelose vereinbar	-	-
Begleiterkran- kungen	Chron. Pan- kreatitis Candida- Endophthal- mitis	AVK; KHK; par- oxysmales Vor- hofflimmern; komp. Herzin- suffizienz; Hypertonie; diffuser Le- berparenchym- schaden; Dia- betes mellitus	-	Diabetes melli- tus; Herzin- suffizienz, rezidivieren- de Nephro- lithiasis
Medikamente zum Zeitpunkt der Blutabnahme	-	Glibenclamid	Pirenzepin Dimethylpoly- siloxan + Alu- miniumhydro- xydgel	Beta-Acetyldi- goxin Spironolacton Cefotaxim

4. Gesunde Kontrollpersonen - nach Einnahme thrombozytenaggregationshemmender Medikamente (Personen Nr.29-33)

Es handelte sich um gesunde Kontrollpersonen beiderlei Geschlechts im Alter zwischen 24 und 52 Jahren, die vor der Blutabnahme Thrombozytenaggregationshemmer eingenommen hatten.

Person Nr.28,29 und 31 hatten mindestens 1g Acetylsalicylsäure innerhalb der letzten 48 Stunden vor der Blutabnahme eingenommen. Person Nr.30 und 32 hatten vor der Blutabnahme jeweils 5 Tage lang ein Kombinationspräparat aus Acetylsalicylsäure und Dipyridamol eingenommen. Auch bei diesem Kontrollkollektiv befanden sich die Werte des kleinen Blutbildes und die Thrombozytenzahlen im Normbereich.

5. ET-Patienten - mit thrombozytenaggregationshemmenden Medikamenten (Personen Nr.34-42)

Diese Gruppe umfaßt 9 Patienten, bei denen in den Jahren von 1975 bis 1983 eine essentielle Thrombozythämie diagnostiziert worden war. ET-bedingte Symptome bei Diagnosestellung bestanden vorwiegend in peripheren und cerebralen Mikrozirkulationsstörungen, ein Patient war bei Diagnosestellung asymptomatisch. Bei teilweise recht hohen Thrombozytenzahlen und therapiebedürftiger Symptomatik wurden diese Patienten derzeit mit Thrombozytenaggregationshemmern behandelt; bei Patient Nr.35,36,40 und 41 war in der Vergangenheit auch eine myelosuppressive Therapie durchgeführt worden. Weitere Informationen zu dieser Gruppe finden sich in Tabelle 3, Seite 20 - 22. Nicht aufgeführt sind dort der Quick-Wert, sowie die Serumkonzentrationen von Natrium und Calcium, die ebenfalls bestimmt wurden, da es sich um Normwerte handelte.

Tab. 3: ET-Patienten - mit thrombozytenaggregationshemmenden Medikamenten

Patient Nr.	34	35	36
Alter/Geschlecht	42/m	82/m	79/w
Diagnose (seit)	ET (11/75)	ET (10/81)	ET (12/83)
Symptomatik bei Diagnose	periphere Mikro- zirkulationsstö- rungen	AVK, KHK periphere Mikro- zirkulations- störungen	AVK; KHK; periphere und cerebrale Mikro- zirkulationsstörun- gen; tiefe Bein- Beckenvenen-, Milz- venenthrombose; Pfortaderverschluß
Thrombozyten $\times 10^9/l$	260 - 906 aktuell: 788	235 - 2400 aktuell: 768	564 - 1940 aktuell: 696
Leukozyten $\times 10^9/l$	9.1	13.7	7.0
Hb / g/dl /	17.3	13.2	13.3
Hb _E / pg /	28.5	25.2	28.6
Knochenmark:			
Megakaryopoese	+	+	+
Megakaryozyten in Gruppen	k.A.	k.A.	+
Granulopoese	+	+	-
Erythropoese	N	-	-
Eisenspeicher	N	N	leer
zytol. Diagnose	ET	n.d.	n.d.
Histol. Diagnose	CMPE	CMGM	MM
Splenomegalie	+	+	N
Bisherige Therapie der ET: AH/MS	AH, Aderlässe	AH/MS	AH/MS
Begleiterkrankungen	-	Diabetes melli- tus komp. Herz- insuffizienz; Niereninsuffi- zienz; chron. Antrumgastritis mit intestinaler Metaplasie	Diabetes mellitus
Medikamente zum Zeit- punkt der Blutabnahme	ASS	ASS + Dipyridamol Thioctsäure Glibornurid	ASS, Isosorbiddi- niträt; Beta-Acetyl- digoxin, Pentoxi- fyllin

Tab. 3: ET-Patienten - mit thrombozytenaggregationshemmenden
Medikamenten (Fortsetzung)

Patient Nr.	37	38	39
Alter/Geschlecht	67/m	74/m	56/m
Diagnose (seit)	ET (11/82)	ET (9/81)	ET (2/82)
Symptomatik bei Diagnose	keine	AVK, KHK; peri- phäre Mikro- zirkulations- störungen	AVK; periphere Mikrozirkulations- störungen
Thrombozyten $\times 10^9/l$	576 - 856 aktuell: 856	559 - 945 aktuell: 810	660 - 1360 aktuell: 1360
Leukozyten $\times 10^9/l$	10.9	8.9	13.9
Hb / g/dl /	16.9	13.6	17.5
Hb _E / pg /	31.0	29.8	31.1
Knochenmark:			
Megakaryopoese	+	+	+
Megakaryozyten in Gruppen	k.A.	+	k.A.
Granulopoese	-	N	N
Erythropoese	-	+	N
Eisenspeicher	N	N	N
zytol. Diagnose	n.d.	ET/RT	ET
Histol. Diagnose	MM	MM	n.d.
Splenomegalie	N	N	N
Bisherige Therapie			
der ET:AII/MS	AH	AH	AH
Begleiterkrankungen	Gicht	Diabetes melli- tus	-
Medikamente zum Zeit- punkt der Blutabnahme	ASS + Dipyrida- mol; Naftidro- furyl-Hydrogenoxa- lat; Benzbromaron	ASS + Dipyridamol Isosorbiddinitrat; Pentoxifyllin; Glisoxepid; Bemetizid + Triamteren Bezafibrat	ASS + Dipyrida- mol

Tab. 3: ET-Patienten - mit thrombozytenaggregationshemmenden
Medikamenten (Fortsetzung)

Patient Nr.	40	41	42
Alter/Geschlecht	73/w	62/m	62/m
Diagnose (seit)	ET (1/81)	ET (6/83)	ET (11/80)
Symptomatik bei Diagnose	periphere und cerebrale Mikro- zirkulations- störungen	periphere und cerebrale Mikro- zirkulations- störungen	periphere Mikro- zirkulationsstö- rungen
Thrombozyten $\times 10^9/l$	269 - 2838 aktuell: 1128	284 - 1200 aktuell: 502	493 - 805 aktuell: 493
Leukozyten $\times 10^9/l$	8.1	9.3	7.4
Hb / g/dl /	11.2	16.0	13.6
Hb _E / pg /	28.6	28.6	30.3
Knochenmark:			
Megakaryopoese	+	+	+
Megakaryozyten in Gruppen	+	k.A.	+
Granulopoese	-	-	+
Erythropoese	-	-	N
Eisenspeicher	N	N	N
Zytol. Diagnose	ET	n.d.	n.d.
Histol. Diagnose	MM	MM	MM
Splenomegalie	N	N	N
Bisherige Therapie der ET: AH/MS	AH/MS Aderlässe	AH/MS	AH
Begleiterkrankungen	-	IgG-Gammo- pathie	-
Medikamente zum Zeit- punkt der Blutabnahme	ASS + Dipyri- damol	ASS; Allopurinol; Triamteren + Hydrochloro- thiazid	ASS + Dipyridamol Reserpin + Clo- pamid + Dihydro- ergocristin- methansulfonat

6. Patienten mit reaktiver Thrombozytose - mit thrombozytenaggregationshemmenden Medikamenten (Personen Nr.43-49)

Die 7 Patienten dieser Gruppe (siehe Tabelle 4, Seite 24 und 25) wurden im Zeitraum zwischen März und Juni 1985 in der Medizinischen Poliklinik der Universität München wegen unterschiedlichen Grunderkrankungen behandelt. Vorherrschende Symptomatik in dieser Gruppe waren arthritische Beschwerden, die mit dem Aggregationshemmer Indometacin therapiert wurden. Drei Patienten mit gefäßbedingtem Beschwerdebild nahmen unter anderem Acetylsalicylsäure ein. Bei Patient Nr.49 wurde zusätzlich noch Prostazyklin i.v. in einer Dosierung von 15ng/kg Körpergewicht angewandt.

Wie in den vorhergehenden Gruppen lagen Quick-Wert und die Serumkonzentrationen von Natrium und Calcium im Normbereich.

7. Patienten mit hohen Thrombozytenzahlen bei myeloproliferativen Erkrankungen (Personen Nr.50-53)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch Untersuchungen am Blut einer Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie und dreier Patienten mit Polycythaemia Vera durchgeführt und mit den Ergebnissen bei essentieller Thrombozythämie verglichen. Diese Patienten sind in Tabelle 5, Seite 26 näher beschrieben.

Tab. 4: Patienten mit RT - mit thrombozytenaggregationshemmenden

Medikamenten

Patient Nr.	43	44	45	46
Alter/Geschlecht	46/m	37/m	79/w	57/w
Diagnose	RT bei Thromb- angiitis obliterans	RT bei florider Psoriasis arthropathica	RT bei Arteri- tis temporalis	RT bei Colitis ulcerosa mit Arthralgien
Thrombozyten				
$\times 10^9/l$	403	978	673	475
Leukozyten				
$\times 10^9/l$	10.1	16.3	10.6	5.4
Hb / g/dl /	13.6	9.2	9.8	12.3
Hb _E / pg /	30.5	20.6	23.2	24.4
Knochenmarks- befund:	-	gesteigerte Megakaryo- u. Granulopoese; verminderte Erythropoese; histol. Dia- gnose mit me- gakaryozytärer granulozytärer Myelose verein- bar	-	-
Begleiterkran- kungen	Hyperthyreo- se bei Struma nodosa; Wurzelkom- pressions- syndrom L ₅ - S ₁	latenter Diabe- tes mellitus; V. a. myelo- proliferative Erkrankung (aufgrund des KM-Befundes)	Diabetes melli- tus, komp. Herzinsuffi- zienz bei KHK	Choleli- thiasis
Medikamente zum Zeitpunkt der Blutabnahme	ASS + Dipyri- damol Nifedipin Amlorid + Hydrochloro- thiazid	Indometacin; Etretinat	ASS; Nifedi- pin; Beta- Acetyldigo- xin + Penta- erythritylte- tranitrat Fluocortolon Eisen-II- Sulfat	Indometacin Ranitidin Cholestyra- min Cotrimoxazol Calciumlactat- gluconat + Calciumcarbo- nat

Tab. 4: Patienten mit RT - mit thrombozytenaggregationshemmenden
Medikamenten (Fortsetzung)

Patient Nr.	47	48	49
Alter/Geschlecht	66/w	78/w	44/m
Diagnose	RT bei seropositiver chronischer Polyarthrit	RT bei seropositiver chronischer Polyarthrit	RT bei Thromboangiitis obliterans mit Gangrän der 5. Zehe, rechts
Thrombozyten $\times 10^9/l$	663	472	424
Leukozyten $\times 10^9/l$	20.8	9.5	7.4
Hb / g/dl /	8.5	10.6	12.3
Hb _E / pg /	27.9	29.1	28.5
Knochenmarksbefund	-	-	-
Begleiterkrankungen:	Diabetes mellitus, Hypothyreose; KHK, AVK, Herzrhythmusstörungen	Hypertonie	Leberparenchymschaden
Medikamente zum Zeitpunkt der Blutabnahme	Indometacin L-Thyroxin Ranitidin Digoxin; Propranolol; Isosorbiddinitrat; Mexiletin; Amiodaron; Fluocortolon Calciumlactat gluconat + Calciumcarbonat; Natriumfluorid	Indometacin	ASS Cotrimoxazol Tramadol; Diklokaliumclorazepat Prostazyklin i. v.

Tab. 5: Patienten mit hohen Thrombozytenzahlen bei myeloproliferativen Erkrankungen

Patient Nr.	50	51	52	53
Alter/Geschlecht	74/w	60/m	71/w	69/w
Diagnose (seit)	PV (5/81)	PV (1/85)	PV (5/73)	CML (12/83)
Symptomatik	periphere Mikrozirkula- tionsstörun- gen	periphere und cerebrale Mikrozirkula- tionsstörun- gen	Beckenvenen- thrombose; Milzinfarkt; AVK, KHK	Epistaxis; Retina- u- Glaskörper- blutungen; Gewichts- abnahme
Thrombozyten $\times 10^9/l$	162 - 1580 aktuell: 515	446 - 719 aktuell: 716	385 - 997 aktuell: 773	431 - 1800 aktuell: 892
Leukozyten $\times 10^9/l$	10.0	7.9	21.4	5.1 - 200 aktuell: 17.0
Hb / g/dl /	19.8	17.3	10.1	12.5
Hb _E / pg /	32.1	28.2	21.4	32.0
Knochenmark:				
Megakaryopoese	+	+	+	+
Megakaryozyten in Gruppen		+		
Granulopoese	+	-	-	++
Erythropoese	+	+	+	-
Eisenspeicher	leer	leer	N	k.A.
Histol. Diagnose	PV	PV	PV	reifzelli- ge granu- lozytäre Myelose
Karyotyp	k.A.	k.A.	Philadelphia Chromosom -	Philadel- phia Chromosom +
Splenomegalie	N	+	+	+
Bisherige Therapie der MPE	MS/AH	AH/Aderlässe	MS/AH Aderlässe	MS
Begleiterkrankungen	-	Nephrolithia- sis	-	-
Medikamente zum Zeit- punkt der Blutabnahme	ASS + Dipyri- danol Pentoxifyllin Reserpin + Clo- pamid + Dihy- droergocristin- methansulfonat	ASS Nifedipin; Atenolol; Allopurinol; Pentoxifyllin	ASS Allopurinol; Calciumlactat- gluconat + Calciumcarbonat Natriumfluorid Beta-Acetyldigo- xin; Busulfan	-

Medikamenteneinflüsse

Im folgenden sind in alphabetischer Reihenfolge die Freinamen der Arzneistoffe aufgeführt, die von einer oder mehreren der untersuchten Personen derzeit eingenommen wurden.

Soweit durch diese Substanzen eine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion, vor allem der Aggregation möglich ist, wird dies durch entsprechende Literaturhinweise belegt.

- Acetylsalicylsäure - Die Acetylsalicylsäure bewirkt eine Hemmung der zweiten Phase der Thrombozytenaggregation nach Adrenalin-, ADP- und Kollagenzugabe; die Thrombin-induzierte und die erste Phase der ADP-, bzw. Adrenalin-induzierten Aggregation sind hiervon kaum betroffen, da der Effekt auf einer Hemmung der Freisetzungsreaktion beruht. Die inhibierende Wirkung der Acetylsalicylsäure wird auf die irreversible Acetylierung der Cyclooxygenase zurückgeführt (Arkel et al., 1976; Gupta et al., 1983; Marx, 1980; O'Brien & Oxon, 1968).

- Allopurinol - Die bei hyperuricämischen Patienten gesteigerte Aggregationsneigung der Thrombozyten kann sich unter der Allopurinol-Therapie normalisieren, da Allopurinol die Aktivierung der Thrombozytenoberfläche verhindert und so die Adhäsions- und Aggregationstendenz der Thrombozyten abschwächt (Bluhm & Riddle, 1973). Es wird auch über eine möglicherweise durch Allopurinol induzierte Thrombozytopenie berichtet (Rosenbloom & Gilbert, 1981).

- Aluminiumhydroxydgel

- Amilorid

- Amiodaron - Bisher wurden in der Literatur keine Auswirkungen von Amiodaron auf hämatologische Parameter erwähnt; aber es besteht die Möglichkeit, daß die Thrombozytenaggregation durch eine dosisabhängige, nicht-kompetitive Hemmung alpha-adrenerger Rezeptoren, die für diese Substanz beschrieben wurde (Polster & Broekhuysen, 1976), gehemmt wird.

- Atenolol - Atenolol verringert die Thrombozytenadhäsion, hat jedoch keine signifikanten Einflüsse auf Adrenalin-,

ADP-, Kollagen- und Serotonin-induzierte Thrombozytenaggregation (Kirch & Ohnhaus, 1984; Luque Otero et al., 1981; Markel et al., 1983).

- Bemetizid

- Benzbromaron

- Beta-Acetyldigoxin

- Busulfan - Im Tierversuch (Kaninchen) ließ sich mit Busulfan eine schwere Thrombozytopenie induzieren, die die Autoren (Evensen et al., 1968) auf eine Depression der Megakaryopoese zurückführen; auch bei der Anwendung am Menschen bewirkt Busulfan eine Senkung der Leukozyten- und Thrombozytenzahlen (Linker et al., 1980). Kutti (1972) beobachtete bei 9 PV-Patienten unter der myelosuppressiven Therapie mit Busulfan zwar einen Abfall der Thrombozytenproduktionsrate, der sich jedoch nicht immer in den peripheren Thrombozytenzahlen ausdrückte. In der Folge der Senkung der Thrombozytenzahlen läßt sich eine Normalisierung der kollageninduzierten Thrombozytenaggregation und das Verschwinden spontaner Plättchenaggregationen beobachten; ein abnormes Aggregationsverhalten nach Adrenalin als Aggregationsauslöser wurde dagegen durch eine Busulfan-Therapie nicht positiv beeinflusst (Barbui et al.; 1983).

- Bezafibrat - Die Thrombozytenaggregation wird durch diese Substanz abgeschwächt (Brunner et al., 1985); es ist vor allem die erste Phase der Aggregation betroffen (Almer & Kjellstoem, 1984).

- Calciumcarbonat

- Calciumlactatgluconat

- Cefotaxim - Die ADP-, Adrenalin- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation läßt unter Einfluß von Cefotaxim manchmal eine Steigerung erkennen; die Thrombozytenzahlen und andere Parameter der Thrombozytenfunktion werden nicht beeinflusst (Andrassy et al., 1983).

- Cholestyramin

- Cimetidin - Bei in vivo Untersuchungen mit Cimetidin wurde keine Hemmung der ADP- und Kollagen-induzierten Thrombozy-

tenaggregation festgestellt (Horton et al.,1983).

- Clopamid

- Cotrimoxazol - Durch die Einnahme dieser Substanzkombination kann eine reversible Thrombozytopenie induziert werden; über eine qualitative Beeinflussung der Thrombozyten ist nichts bekannt (Böse et al.,1974;Dickson,1978;Claas et al.,1979).

- Digoxin - Unter oraler Digoxin-Therapie wurde eine Reduktion der Größe und Anzahl von Aggregaten nach ADP-Zugabe beobachtet (Ware et al.,1985).

- Dihydralazin-Sulfat

- Dihydroergocristinmethansulfonat

- Dikaliumclorazepat

- Dimethylpolysiloxan

- Dipyridamol - Dipyridamol wirkt in vivo über eine Prosta-zyklinfreisetzung oder -wirkungsverstärkung, in vitro über eine geringe Hemmung der Thrombozytencycloxygenase und der Phosphodiesterase hemmend auf die Thrombozytenaggregation (Marx,1980).

- Doxycyclin - Bei in-vivo Untersuchungen an Ratten wurde unter Doxycyclineinfluß zwar eine Verlängerung der Blutungszeit, aber keine Beeinträchtigung der ADP- und Kollagen-induzierten Aggregation festgestellt (Bengmark et al.,1981).

- Doxylaminsuccinat - Ein Patient nahm ein Kombinationspräparat ein, das als Wirksubstanzen Doxylaminsuccinat,Ephedrin Etafedrin und Theophyllin enthielt; in der Literatur finden sich keine Angaben zu Wirkungen dieses Präparats (Ditenate®) auf die Thrombozytenfunktion. Es ist allerdings durchaus vorstellbar, daß Theophyllin als Phosphodiesteraseinhibitor (Kagan & Rose,1976) über eine Erhöhung der thrombozytären cAMP-Spiegel eine Hemmung der Thrombozytenaggregation bewirkt; eine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch die Sympathomimetika Ephedrin und Etafedrin ist ebenfalls nicht auszuschließen.

- Eisen(II)-sulfat

- Ephedrin - siehe Doxylaminsuccinat

- Etafedrin - siehe Doxylaminsuccinat
- Etretnat - Dieses Retinoid hat zwar keine Wirkung auf die Thrombozytenfunktion, kann aber eine Thrombozytopenie auslösen (Weber & Obrecht, 1983).
- Fluocortolon - Unter Cortisol-Therapie wird die Thrombozytenzahl im peripheren Blut rasch um 30%-60% erhöht; die übrigen Gerinnungsfaktoren werden nicht beeinflusst (Labhart, 1971); es wurden aber auch Thrombozytopenien nach langer hoch dosierter Glukokortikoidgabe beschrieben (Hiller, 1980).
- Glibornurid - Eine leichte reversible Depression der Thrombozytenzahlen unter dieser Substanz ist nicht sicher auszuschließen, die anderen Gerinnungsfaktoren werden nicht beeinflusst (Voß et al., 1972). Hinsichtlich der Thrombozytenfunktion wird über eine Normalisierung der bei Diabetikern verstärkten Aggregationsneigung berichtet (Zurro et al., 1975).
- Glisoxepid
- Hydrochlorothiazid - Bei Patienten mit Herzinsuffizienz Grad I wurde während der Therapie mit einer Kombination aus Amlorid und Hydrochlorothiazid (Moduretik[®]) eine Zunahme der "koagulierenden Faktoren" im Blut beobachtet; bei Patienten mit Herzinsuffizienz Grad II und III war dagegen eine Abnahme der Koagulationstendenz festzustellen. In keinem der untersuchten Fälle wurde unter der Moduretik[®]-Therapie eine thrombotische Komplikation registriert (Mathew, 1980).
- Indometacin - Die zweite Phase der durch mittlere ADP- und Adrenalin-Konzentrationen induzierten Thrombozytenaggregation wird ab einer Indometacin-Konzentration von 0,06 µg/ml im Testansatz blockiert; hohe Adrenalinkonzentrationen können diesen Effekt wieder aufheben, da er auf einer reversiblen, kompetitiven Hemmung der Cyclooxygenase beruht (Rane et al., 1978).
- Isosorbiddinitrat - Bei in-vitro und in-vivo Untersuchungen wurde eine dosisabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation nach Adrenalin-, ADP-, Arachidonsäure-, Kollagen- und Thrombinzugabe festgestellt (De Caterina et al., 1983).

- **Levothyroxin**
- **Magnesiumhydroxydgel**
- **Metenololacetat** - Unter Anabolika-Therapie sind Anzeichen für eine Aktivierung der Myelopoese beschrieben worden, die v.a. auch einen Anstieg der Thrombozytenzahl zur Folge hatte (Shahidi & Diamond, 1961); andere Autoren hingegen konnten keine Steigerung der Thrombozytenzahl unter Therapie mit Metenololacetat feststellen (Gerhartz, 1964).
- **Methyldigoxin** - siehe Digoxin
- **Mexiletin** - Die Adrenalin-, ADP- und Kollagen-induzierte Aggregation werden bei einer Mexiletinkonzentration von $1,7 \times 10^{-4} \text{ M}$ signifikant gehemmt (Rubegni et al., 1983).
- **Naftidrofuryl-Hydrogenoxalat** - Laut Rubegni et al. (1983) werden die ADP-, Adrenalin und Kollagen-induzierte Aggregation bei einer Naftidrofurylkonzentration von $1,7 \times 10^{-4} \text{ M}$ signifikant gehemmt (Rubegni et al., 1983); andere Arbeitsgruppen (Heidrich et al., 1979; Janka et al., 1982) konnten dagegen keine hemmende Wirkung von Naftidrofuryl auf die Thrombozytenfunktion feststellen.
- **Natriumfluorid**
- **Nifedipin** - Die Arachidonsäure- und Kollagen-induzierte Aggregation, sowie die Thromboxan- A_2 -Synthese wurden bei in vitro Untersuchungen nach Vorinkubation mit Nifedipin gehemmt (Seuter & Perzborn, 1984). Ähnliche Wirkungen werden auf die ADP- und Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation beschrieben (Onoda et al., 1984). Bei ex vivo Untersuchungen fanden andere Autoren keinen signifikanten Effekt einer Nifedipin-Therapie auf die ADP- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation (Lenci et al., 1984).
- **Pentaerythrylltetranitrat**
- **Pentoxifyllin** - Es wird eine starke inhibitorische Wirkung von Pentoxifyllin auf die Thrombozytenaggregation beschrieben (Gincherman, 1982; Ott et al., 1983; Pilla et al., 1983; Lee et al., 1985), die wohl auf eine Steigerung der Prostazyklin-Aktivität der Gefäßwände zurückzuführen ist; denn trotz seines inhibitorischen Effekts auf die Thrombozyten-Phospho-

diesterase (Ambrus et al.,1984) beeinflusst Pentoxifyllin ohne Prostazyklin in vitro die thrombozytären cAMP-Spiegel und die Thrombozytenaggregation kaum, wohingegen eine Kombination von Pentoxifyllin und Prostazyklin die cAMP-Spiegel deutlich erhöht und eine Aggregationshemmung bewirkt, die in diesem Ausmaß nicht nur der eingesetzten Prostazyklinmenge zugeschrieben werden kann (Weithmann,1981).

- Pirenzepin

- Propranolol - Bei Konzentrationen, die etwa zwei Zehnerpotenzen höher lagen als die therapeutischen Wirkspiegel in vivo, wurde bei in vitro Untersuchungen eine halbmaximale Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation festgestellt (Schulz,1984); andere Autoren (Mehta et al., 1983) berichten auch über eine Hemmung der ADP-, Adrenalin- und Arachidonsäure-induzierten Aggregation bei hohen Propranolol-Konzentrationen.

- Prostazyklin - Über die Erhöhung der cAMP-Spiegel wirkt Prostazyklin als starker Thrombozytenaggregationshemmer (Mills & Smith,1971).

- Ranitidin - Im Gegensatz zu den H₂-Antagonisten, die sich vom Imidazol herleiten, beeinflusst Ranitidin die Thrombozytenaggregation nicht (Horton et al.,1983;Lübcke & Herrmann, 1982). Auch die Thrombozytenzahlen bleiben unter einer Ranitidin-Therapie unverändert (Stadnicki,1984).

- Reserpin

- Salbutamol

- Spironolacton

- Theophyllin - siehe Doxylaminsuccinat

- Thioctsäure

- Tramadol

- Triamteren

Material und Methoden

1. In-vitro Aggregationen mit unterschiedlichen aggregationsauslösenden Substanzen

1.1 Aggregationsauslösende Substanzen und Lösungsmittel

- Adrenalin (Suprarenin[®]; Hoechst, Frankfurt) in physiologischer Kochsalzlösung
- Adenosindiphosphat als Dinatriumsalz (Boehringer, Mannheim) gelöst in destilliertem Wasser
- Kollagen-Reagens (Hormon-Chemie, München), gelöst in isotoner Glucoselösung von pH 7,2-7,9
- Plättchen-aktivierender Faktor, 1-Octadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin (Bachem, Bubendorf/Schweiz), gelöst in physiologischer Kochsalzlösung mit 0,25% BSA (Rinder-Serum-Albumin) und 10% Äthanol
- Thrombin als Lyophilisat aus Human-Plasma (Boehringer, Mannheim), gelöst in physiologischer Kochsalzlösung

1.2 Gewinnung von PRP und PFP

PRP (plättchenreiches Plasma) wurde aus Citrat-Blut (1 ml 3,8%-ige Na-Citrat-Lösung, 9 ml ungestautes Blut aus der Cubitalvene) durch 15-minütige Zentrifugation (Labofuge I, Heraeus-Christ, Osterode) bei 200xg und Raumtemperatur gewonnen. Citrat wurde als Antikoagulant anstelle von EDTA verwendet, um die ADP-Sensitivität der Plättchen zu erhalten (Ardlie et al., 1970).

Das PRP wurde verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahrt und nach einer Stunde zur Aggregationsmessung eingesetzt. Eine Standardisierung der Umgebungstemperatur und des Zeitraumes zwischen Blutabnahme und Messung ist notwendig, da das Aggregationsverhalten der Thrombozyten durch diese Faktoren stark beeinflusst wird (Breddin, 1975). Zur Illustration dieses Tatbestandes siehe Abbildung 1, Seite 35.

Nach Abtrennen des PRP wurde PFP (plättchenfreies Plasma) durch 5-minütige Zentrifugation bei 15600xg und Raumtemperatur in der Eppendorf-Zentrifuge (Modell 5414S; Eppendorf, Hamburg) hergestellt.

PFP diente zur Einstellung der Thrombozytenzahl auf 300.000/ μ l.

1.3 Untersuchung des Aggregationsverhaltens

Die Messung der Aggregation basierte auf der von Born beschriebenen Methode (Born, 1963). Die Transmission einer Thrombozytensuspension im Eigenplasma wurde über eine Photozelle gemessen, die mit einem Schreiber verbunden war. Die Thrombozyten wurden in einer Plastik-Küvette bei 37° C und 1000 Umdrehungen/Minute gerührt.

Nach 3-minütiger Vorinkubation wurde ein Aggregationsauslöser zugesetzt; die eintretende Formänderung und Aggregation der Thrombozyten führte zu einer Transmissionszunahme im Plasma. Die hieraus resultierende Spannungsänderung wurde vom Schreiber in Form einer Aggregationskurve kontinuierlich aufgezeichnet.

Bei der Eichung des BD-9 Zweikanal-Schreibers (Kipp & Zonen, Schönberg/Ts.; Papiervorschub 20 mm/Minute, maximale Spannungsänderung 20mV) wurde die Transmission des PRP auf 10% gestellt, die des PFP auf 95%.

1.4 Auswertung der Aggregationsversuche

Als Maß für die Aggregation diente die Fläche unter der vom Schreiber aufgezeichneten Transmissionskurve $T(t)$; integriert wurde jeweils über einen Zeitraum von drei Minuten, bei einem Papiervorschub von 2cm/Minute.

Die Fläche unter den Kurven wurde mit einem Planimeter (Fa. Ott, Kempten) bestimmt. Jede Kurve wurde 4 mal ausgemessen; der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4% und 6%.

Aus den vier Meßwerten wurde dann der Mittelwert gebildet; dieser ging in die statistische Auswertung mit dem t-Test für unverbundene Stichproben ein.

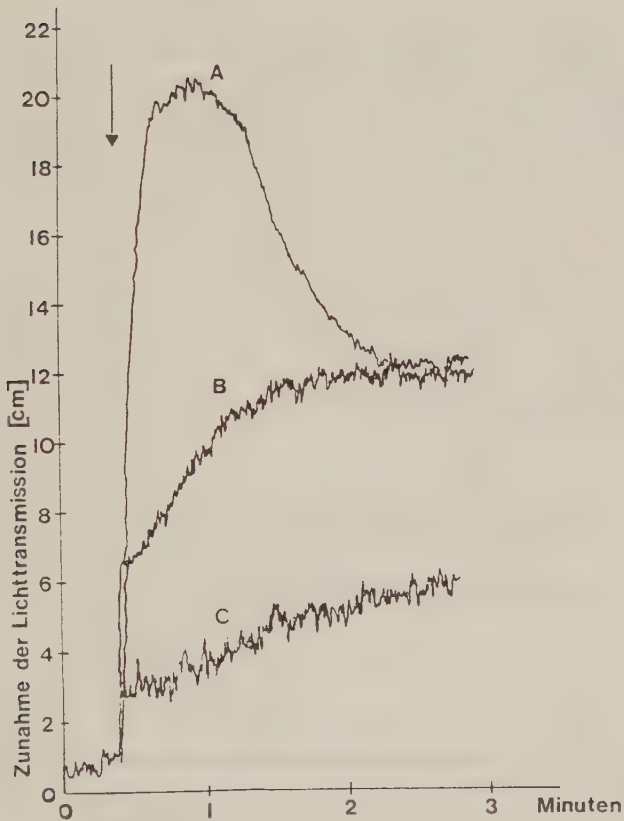


Abb.1 Temperaturabhängigkeit der Aggregation

PRP eines Spenders wurde nach Vorinkubation bei verschiedenen Temperaturen mit Adrenalin (Endkonzentration 10 ng/ml) aggregiert. A: 0° C; B: 20° C; C: 37° C; der Pfeil markiert die Adrenalinzugabe.

2. Bestimmung der cAMP-Spiegel in Thrombozyten

2.1 Reagenzien

- 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (Serva-Feinbiochemica GmbH, Heidelberg), im folgenden mit IBMX abgekürzt, gelöst in 0,1 N NaOH-Lösung, die 10% Äthanol enthielt.
- 0,5%ige Lösung des Äthylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalzes (Dihydrat), abgekürzt als Na-EDTA
- cAMP(³H)-Radioassay Kit TRK 432 (Amersham Buchler GmbH, Braunschweig)
- 0,3 M Trichloressigsäure, abgekürzt als TCA
- 0,25 N NaOH
- PCS II, Flüssigszintillator auf Xylolbasis (Amersham Buchler GmbH, Braunschweig)
- 0,1 N NaOH
- Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagens
- 3 M TCA
- Lösung A: 10% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH
- Lösung B: 0,0122% CuSO₄·x5 H₂O in 0,0244% Na-K-Tartrat-Lösung
- Lösung C: 41 ml Lösung B und 10 ml Lösung A

2.2 Untersuchungsmaterial

Der basale cAMP-Gehalt sollte aus gewaschenen Thrombozyten bestimmt werden.

PRP wurde nach der bereits beschriebenen Methode (siehe 2.2) gewonnen. Bei der Abnahme des Vollblutes war IBMX (Endkonzentration 1×10^{-4} M) vorgegeben, um einen Abbau des cAMP durch die Phosphodiesterase zu verhindern (Cox et al., 1984). Die Thrombozyten wurden durch 2-minütige Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge (Modell 5414 S; Eppendorf, Hamburg) bei 15.600xg und Raumtemperatur sedimentiert, zweimal mit

0,5% Na-EDTA gewaschen und dann bis zur Bestimmung bei -70°C aufbewahrt.

2.3 Durchführung des cAMP-Tests

Der Test basiert auf der kompetitiven Bindung von unmarkiertem cyclischem AMP und einer definierten Menge an tritium-markiertem cAMP an ein spezifisches Bindungsprotein mit hoher Affinität für cAMP. Der Anteil des proteingebundenen radioaktiven cAMP ist der Konzentration an nicht markiertem cAMP umgekehrt proportional. Das nicht gebundene cAMP wird durch Adsorption an Aktivkohle von dem proteingebundenen Anteil durch Zentrifugation abgetrennt. Ein Aliquot des Überstandes wird im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Durch Interpolation aus einer Standardkurve kann dann der cAMP-Gehalt der Probe ermittelt werden.

Die Proben wurden in folgender Weise für die Bestimmung vorbereitet: der Thrombozyten-Rückstand wurde in Tris/EDTA-Puffer (Endkonzentration Tris: $1,25 \times 10^{-5}\text{M}$; Endkonzentration EDTA: 10^{-6}M) aufgenommen, resuspendiert und durch Zugabe von TCA (Endkonzentration: $1,5 \times 10^{-5}\text{M}$) enteiweißt. Nach 2-minütiger Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge bei $15.600 \times g$ wurde der Überstand mit NaOH-Lösung (Endkonzentration: $1,71 \times 10^{-5}\text{M}$) neutralisiert.

Die cAMP-Standardreihe wurde in gleicher Weise mit TCA und NaOH behandelt.

Jeweils ein Aliquot des neutralisierten Zellextraktes, bzw. der Standardreihe wurde mit tritiiertem cAMP (Endkonzentration: 10^{-7}M) und $100\text{ }\mu\text{l}$ der Bindungsproteinlösung vermischt und anschließend 2 Stunden bei 4°C inkubiert.

Danach wurde Aktivkohlesuspension zugesetzt und durch Zentrifugation (2 Minuten bei $15.600 \times g$) das proteingebundene cAMP vom ungebundenen, an Aktivkohle adsorbierten cAMP getrennt.

Ein Aliquot des klaren Überstandes wurde mit PCS II im Beta-Szintillationszähler (Tri Carb Liquid Scintillator Spectromer

ter AAA Model 3390; Packard Instruments, Frankfurt) 10 Minuten lang gezählt.

Der Eiweißgehalt der Proben wurde nach Lowry bestimmt (Lowry et al., 1951). Das ausgefällte Thrombozytenprotein wurde in 0,1 N NaOH resuspendiert; ein Aliquot dieser Suspension wurde 30 Minuten lang mit 0,5 ml Lösung C inkubiert und dann mit 50 μ l Folin-Reagens versetzt. Nach weiteren 30 Minuten erfolgte die Extinktionsmessung bei 750 nm am Gilford-Spectrophotometer Modell 240 (Gilford Instruments Laboratories Inc., Oberlin/Ohio).

3. Bestimmung der Plasmakonzentrationen von alpha₁-saurem Glykoprotein und Fibrinogen

Die Plasmaspiegel an alpha₁-saurem Glykoprotein und Fibrinogen wurden mittels NOR-Partigen-Immundiffusionsplatten (Behringwerke AG, Marburg; Bestell-Nr.05 LH 02, bzw.05 LI 02) bestimmt.

Die Bestimmung basiert auf dem Prinzip der einfachen, radialen Immundiffusion (Becker et al.,1968).

Die Partigenplatten wurden mit 5 µl PFP (siehe Material und Methoden, 1.2) beschickt und 2 Tage bei Raumtemperatur entwickelt.

Nach 2 Tagen wurden die Durchmesser der Präzipitatringe mit einem Meßprojektor für Immunanaylsen (Behringwerke AG, Marburg) ausgemessen; jeder Durchmesser wurde 6 mal bestimmt und dann der Mittelwert aus den Meßwerten gebildet. Aus diesem ließ sich anhand einer mitgelieferten Bezugswert-Tabelle die Plasmakonzentration des jeweiligen Proteins ermitteln.

Der relative Fehler bei der Bestimmung des Durchmessers lag bei 1%. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse mit dem t-Test für unverbundene Stichproben wurde der Mittelwert aus den mehrfach bestimmten Meßwerten verwendet.

Ergebnisse

1. In-vitro Aggregationen mit unterschiedlichen Aggregationsauslösern

1.1 Aggregationen mit Adrenalin als Aggregationsauslöser

Das Aggregationsverhalten wurde bei einer AdrenalinKonzentration von 0,01 µg/ml untersucht. Diese Konzentration löste 30% der Maximalaggregation aus und ermöglichte es, Aggregationskurven von gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit ET und Patienten mit reaktiver Thrombozytose im gleichen Meßbereich des Schreibers aufzuzeichnen, und somit direkt zu vergleichen.

Als Maß für die Aggregabilität war die Fläche unter der Aggregationskurve nach einer Zeitspanne von 3 Minuten festgelegt worden.

Ohne den Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente zeigten die Patienten mit ET 47% (siehe Tab.16, Seite 66), unter dem Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente 35% (siehe Tab.17, Seite 66) der Aggregabilität der jeweiligen gesunden Kontrollpersonen. Diese Unterschiede waren in beiden Fällen statistisch hoch signifikant (ohne Thrombozytenaggregationshemmer $p < 0,0005$; mit Thrombozytenaggregationshemmern $p < 0,0005$; siehe Abb.2).

Im Gegensatz hierzu zeigten Patienten mit reaktiver Thrombozytose deutlich gesteigerte Aggregationsantworten. Ohne Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente betrug ihre Aggregabilität im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe 223% (siehe Tab.16, Seite 66; $p < 0,0005$).

Bei Messungen unter Medikamenteneinfluß verringerte sich der Unterschied zwischen den beiden Personengruppen, so daß die Patienten mit reaktiver Thrombozytose nur noch 168% Aggregabilität gegenüber Gesunden zeigten (siehe Tab.17; $0,1 > p > 0,05$). Dies liegt jedoch nicht daran, daß die Aggregationsantworten der Patientengruppe mit reaktiver Thrombozytose abgeschwächt

wurden -sie waren im Gegenteil noch stärker ausgeprägt-, sondern daran daß das Normalkollektiv eine um 56% gesteigerte Aggregabilität aufwies.

Beim Vergleich von ET-Patienten mit Thrombozytenaggregationshemmern und solchen ohne diese Medikamente ließ sich ein vergleichbarer Wert für die Aggregabilität feststellen.

Zur Illustration sind in Abbildung 2a, Seite 45 typische Schreiberkurven dargestellt, wie sie bei adrenalininduzierten Aggregationstests (Adrenalinkonzentration: 0.01 µg/ml) aufgezeichnet wurden.

Die Auswertung der Aggregationskurven dreier Patienten mit PV, die Thrombozytenaggregationshemmer einnahmen, ergab folgenden Mittelwert: $10,44 \text{ cm}^2 \pm 2,25 (\bar{x} \pm \text{S.E.M.}; n=3)$, was 36% der Aggregabilität der entsprechenden gesunden Kontrollpersonen entspricht. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,01$). Die Patienten mit PV reagierten also auf Adrenalin als Aggregationsauslöser in ähnlichem Maße wie Patienten mit ET.

Die Thrombozyten einer Patientin mit CML und hohen Thrombozytenzahlen hingegen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung keinerlei Medikamente einnahm, zeigten eine Aggregationsantwort, die mit einem Aggregabilitätswert von $23,26 \text{ cm}^2$ im oberen Bereich der Werte gesunder Kontrollpersonen lag. Diese Aussage deckt sich mit Literaturbefunden (Ginsburg, 1975).

KP	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Aggregabilität / cm ² /	19.53	22.75	24.3	19.9	13.17	22.77	16.77	15.57	13.9	11.87

ET	19	20	21	22	23	24	RT	25	26	27	28
Aggregabilität / cm ² /	5.83	10.06	12.22	5.7	10.5	7.45	Aggregabi- lität / cm ² /	41.86	37.65	53.29	28.87

Tabelle 6: In-vitro Aggregationen mit Adrenalin - ohne Thrombozytenaggregationshemmer

Adrenalin-Konzentration 0.01 µg/ml

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Alle drei Personengruppen nahmen derzeit keine thrombozytenaggregationshemmenden Medikamente ein.

Die Aggregabilität in cm² entspricht der Fläche unter der Aggregationskurve. Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; angegeben ist der Mittelwert aus den vier Meßwerten. Der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0.4 % und 6 %.

KP	29	30	31	32	RT	43	44	46	48
Aggregabilität	23,3	31,16	34,23	24,77	Aggregabilität	40,5	76,35	30,23	44,33
/ cm ² /					/ cm ² /				

ET	35	36	37	38	39	40	41	42
Aggregabilität	6,56	7,93	8,42	9,66	14,12	14,77	9,9	10,62
/ cm ² /								

Tabelle 7: In-vitro Aggregationen mit Adrenalin - mit Thrombozytenaggregationshemmern

Adrenalin-Konzentration: 0.01 µg/ml

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Folgende thrombozytenaggregationshemmenden Substanzen waren eingenommen worden:

Acetylsalicylsäure von: Person Nr. 29, 30, 32, 36, 41

Acetylsalicylsäure + Dipyridamol von: Person Nr. 31, 35, 37, 38, 39, 42, 43

Indometacin von: Person Nr. 44, 46, 48

Die Aggregabilität in cm² entspricht der Fläche unter der Aggregationskurve. Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; angegeben ist der Mittelwert aus den vier Meßwerten. Der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 % und 6 %.

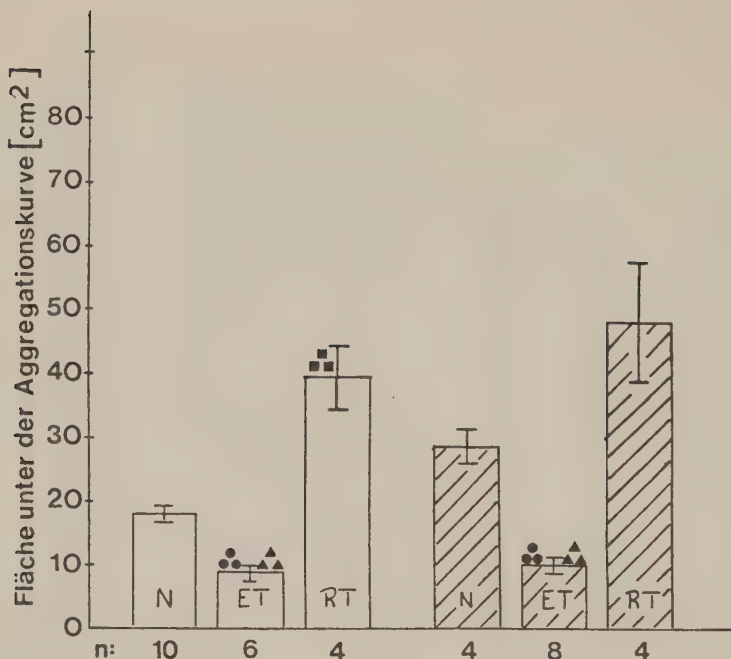


Abb.2 Adrenalin-induzierte in-vitro Aggregation

Säulen geben die Fläche unter der Aggregationskurve nach 3 Minuten wieder (ohne Thrombozytenaggregationshemmer, siehe Tab.1; mit Thrombozytenaggregationshemmern, siehe Tab.2).

Durch vertikale Balken wird die Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt.

Adrenalkonzentration: 0,01 µg/ml

N: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

n bezeichnet die Anzahl der statistisch ausgewerteten Meßwerte; die statistische Auswertung erfolgte nach dem ungepaarten t-Test.

●● p < 0,0005 (Vergleich zwischen N und ET)

▲▲ p < 0,0005 (Vergleich zwischen ET und RT)

■ ■ p < 0,0005 (Vergleich zwischen N und RT)

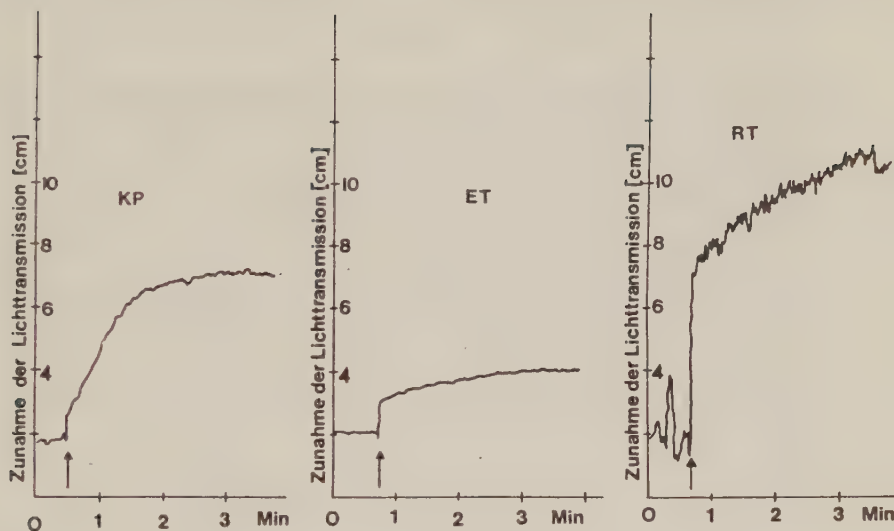


Abb.2a Typische Aggregationskurven bei adrenalininduzierter in-vitro Aggregation

Dargestellt sind Schreiberkurven, die bei einer Endkonzentration von 10 ng/ml Adrenalin aufgezeichnet wurden und als typische Beispiele für die jeweilige Gruppe dienen können. Der Pfeil markiert die Adrenalinzugabe.

KP: Gesunde Kontrollperson (Nr. 6)

ET: Patient mit essentieller Thrombozythämie (Nr. 24)

RT: Patient mit reaktiver Thrombozytose (Nr. 27)

1.2 Aggregationen mit ADP als Aggregationsauslöser

ADP (Endkonzentration 0,01 μ M) als Aggregationsauslöser führte bei den untersuchten Personen rasch zu einer irreversiblen Aggregation.

Bei den Messungen ohne den Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente zeigten die Patienten mit ET 61% der Aggregabilität gesunder Kontrollpersonen ($p < 0,0025$), wohingegen die Patienten mit reaktiver Thrombozytose im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 138% wieder ein deutlich gesteigertes Aggregationsverhalten aufwiesen (Tab.16, Seite 66; Abb.3).

Die Patienten mit ET unterschieden sich also auch statistisch signifikant ($p < 0,01$) von den untersuchten Patienten mit reaktiver Thrombozytose.

Bei den Messungen unter dem Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern ließen die untersuchten Normalpersonen - wie auch schon bei Adrenalin beobachtet - um 41% gesteigerte Aggregationsantworten gegenüber dem unbehandelten Normalkollektiv erkennen (Tab.16 und 17, Seite 66; Abb.3). Patienten mit reaktiver Thrombozytose dagegen zeigten mit um 60% niedrigeren Werten einen deutlichen Abfall in ihrer Aggregabilität, so daß sie nun sogar nur noch 76% derjenigen von Patienten mit ET, bzw. 40% derjenigen der gesunden Kontrollgruppe aufwiesen (Tab.16 und 17, Seite 66; Abb.3).

Dies verdeutlicht, daß in der Gruppe mit reaktiver Thrombozytose bestimmte Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure, Acetylsalicylsäure + Dipyridamol oder Indometacin die ADP-induzierte Aggregation in starkem Maße hemmen, während sich dieselben Thrombozytenaggregationshemmer kaum hemmend auf die Adrenalin-Antwort auswirkten.

Der statistisch signifikante Unterschied zwischen Patienten mit ET und Gesunden blieb auch unter dem Einfluß von thrombozytenaggregationshemmenden Medikamenten erhalten ($p < 0,01$); die Patientenaggregabilität machte nur 51% derjenigen des Normalkollektivs aus (Tab.17, Seite 66; Abb.3).

Der Mittelwert aus den Untersuchungen an 2 Patienten mit PV, die unter anderem mit Thrombozytenaggregationshemmern therapiert wurden, betrug $20,61 \text{ cm}^2$, lag also noch 38% unter dem Wert für ET-Patienten.

Die Untersuchungen an Thrombozyten der bereits unter Ergebnisse 1.1 beschriebenen Patientin mit CML und hohen Thrombozytenzahlen, die ohne den Einfluß von Medikamenten stattfanden, ergaben mit $62,6 \text{ cm}^2$ einen Aggregabilitätswert, der deutlich über demjenigen des entsprechenden Kontrollkollektivs lag und fast denjenigen der Patienten mit reaktiver Thrombozytose erreichte. Was das Ausmaß ihrer Aggregationsantwort anbelangt, verhält sie sich also hier - wie auch schon bei der Adrenalin-induzierten Aggregation - ähnlich wie die Patienten mit reaktiver Thrombozytose.

KP	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	13
Aggregabilität	38,28	28,37	54,02	39,13	42,92	67,55	51,25	41,12	47,1	43,82	54,97
/ cm ² /											

ET	18	19	20	21	23	24	RT	25	26	27	28
Aggregabilität	25,8	24,3	30,0	33,42	33,05	23,55		47,92	109,88	48,28	67,1
/ cm ² /											

Tabelle 8: In-vitro Aggregationen mit ADP - ohne Thrombozytenaggregationshemmer

ADP-Konzentration: 0.01 μ M

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Alle drei Personengruppen nahmen derzeit keine thrombozytenaggregationshemmenden Medikamente ein.

Die Aggregabilität in cm² entspricht der Fläche unter der Aggregationskurve. Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; angegeben ist der Mittelwert aus den vier Meßwerten. Der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 % und 6 %.

KP	30	31	32	RT	43	44	45	46	47	48
Aggregabilität	59,35	87,16	49,47	Aggregabilität	16,97	14,8	21,65	61,6	21,3	16,63
/ cm ² /				/ cm ² /						

ET	34	37	39	40	42
Aggregabilität					
/ cm ² /	22,83	37,02	44,3	34,15	30,12

Tabelle 9: In-vitro Aggregation mit ADP - mit Thrombozytenaggregationshemmern

ADP-Konzentration 0,01 µM

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Folgende thrombozytenaggregationshemmenden Substanzen waren eingenommen worden:

Acetylsalicylsäure von: Person Nr. 30, 32, 34, 45

Acetylsalicylsäure + Dipyridamol von: Person Nr. 31, 37, 39, 40, 42, 43

Indometacin von: Person Nr. 44, 46, 47, 48

Die Aggregabilität in cm² entspricht der Fläche unter der Aggregationskurve.
Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; angegeben ist der Mittelwert aus den vier Meßwerten. Der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 % und 6 %.

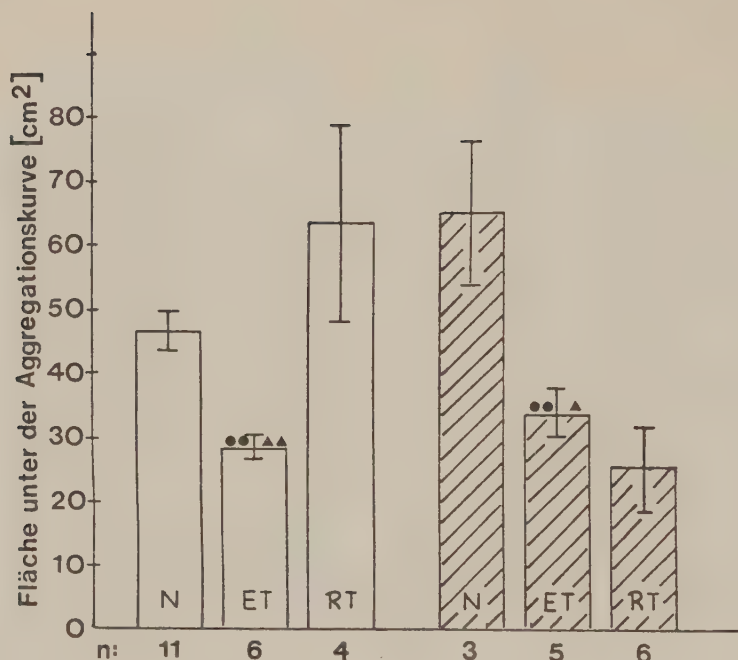


Abb.3 ADP-induzierte in-vitro Aggregation

Säulen geben die Fläche unter der Aggregationskurve nach 3 Minuten wieder (ohne Thrombozytenaggregationshemmer, siehe Tab.3; mit Thrombozytenaggregationshemmern, siehe Tab.4).

Durch vertikale Balken wird die Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt.

ADP-Konzentration: 0,01 μ M

N: Normalpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

n bezeichnet die Anzahl statistisch ausgewerteter Meßwerte; die statistische Auswertung erfolgte nach dem un-gepaarten t-Test.

●● $p < 0,01$ (Vergleich zwischen N und ET)

▲ $p < 0,05$; ▲▲ $p < 0,01$ (Vergleich zwischen ET und RT)

■ $p < 0,05$ (Vergleich zwischen N und RT)

1.3 Aggregationen mit Kollagen als Aggregationsauslöser

In der verwendeten Konzentration (Endkonzentration 0,1 µg/ml) löste Kollagen eine irreversible Aggregation aus, die langsamer als bei ADP eintrat.

Bei den Messungen ohne den Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente zeigten ET-Patienten nur 35% der Aggregabilität gesunder Kontrollpersonen (Tab.16, Seite 66; Abb.4); dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant ($p < 0,0005$).

Eine klare Abgrenzung zu Patienten mit reaktiver Thrombozytose, die zwar mit 88% der Aggregabilität der Kontrollgruppe einen viel höheren Durchschnittswert, aber auch eine größere Streubreite aufwiesen, war jedoch nicht möglich (Tab.16, Seite 66; Abb.4).

Der durchschnittliche Aggregabilitätswert der untersuchten ET-Patienten mit Thrombozytenaggregationshemmern lag 30% über demjenigen der unbehandelten ET-Patienten (Tab.16 und 17, Seite 66); aber sie befanden sich damit immer noch um 32% unter dem Durchschnittswert der Gruppe gesunder Kontrollpersonen, die unter Medikamenteneinfluß eine um 31% abgeschwächte Aggregabilität gegenüber den Messungen ohne Thrombozytenaggregationshemmer aufwiesen (Tab.16 und 17, Seite 66; Abb.4). Es handelt sich hierbei um dasselbe mit Thrombozytenaggregationshemmern behandelte Normalkollektiv, das auch schon bei der Adrenalin- und ADP-induzierten Aggregation zum Einsatz kam; dort übten jedoch die Thrombozytenaggregationshemmer, vergleicht man mit der unbehandelten Kontrollgruppe, keinen inhibierenden Einfluß auf das Aggregationsverhalten aus, während dies ja bei Kollagen der Fall war (Abb.2, 3, 4).

Besonders stark nahmen unter dem Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern die Aggregationsantworten der Patienten mit reaktiver Thrombozytose ab; sie lagen um 44% unter den Werten, die ohne Medikamenteneinfluß ermittelt wurden (Tab.16 und 17, Seite 66; Abb.4), und damit nur noch 6% über dem

Aggregabilitätswert der Patienten mit ET (Tab.17; Abb.4).

Die Aggregabilitätswerte dreier Patienten mit PV, die Thrombozytenaggregationshemmer einnahmen, ergaben einen Mittelwert von $36,12 \text{ cm}^2$, der 9% unter dem Wert für die gesunde Kontrollgruppe, aber immer noch deutlich über demjenigen für Patienten mit ET oder reaktiver Thrombozytose lag.

Auch auf die Kollagenstimulation reagierte die untersuchte Patientin mit CML deutlich stärker als die übrigen Patienten mit einer myeloproliferativen Erkrankung. Es läßt sich allerdings nur diese qualitative Aussage machen, da die Aggregationskurve nach 1,5 Minuten außerhalb des 20 mV-Meßbereiches verlief.

KP	2	3	4	5	6	7	9
Aggregabilität / cm ² /	62,57	54,66	55,85	47,67	68,42	48,8	72,02

ET	18	20	21	22	23	24	RT	25	26	27
Aggregabilität / cm ² /	16,3	24,85	11,82	24,17	28,85	18,6	Aggregabili- tät / cm ² /	33,89	91,31	31,07

Tabelle 10: In-vitro Aggregationen mit Kollagen - ohne Thrombozytenaggregationshemmer

Kollagen-Konzentration: 0,1 µg/ml

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Alle drei Personengruppen nahmen derzeit keine thrombozytenaggregationshemmenden
Medikamente ein.

Die Aggregabilität in cm² entspricht der Fläche unter der Aggregationskurve. Jede
Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; angegeben ist der Mittelwert aus
den 4 Meßwerten. Der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 %
und 6 %.

KP	29	30	31	32	RT	44	45	46	47	48
Aggregabilität	43,26	24,7	32,52	59,2	Aggregabilität	20,33	32,77	34,03	19,8	36,9
/ cm ² /										

ET	34	35	37	39	41	42
Aggregabilität	27,22	30,1	30,12	29,5	24,87	20,22
/ cm ² /						

Tabelle 11: In-vitro Aggregationen mit Kollagen - mit Thrombozytenaggregationshemmern

Kollagen-Konzentration: 0,1 µg/ml

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Folgende thrombozytenaggregationshemmenden Substanzen waren eingenommen worden:

Acetylsalicylsäure von: Person Nr. 29, 30, 32, 34, 41, 45

Acetylsalicylsäure + Dipyridamol von: Person Nr. 31, 35, 37, 39, 42

Indometacin von: Person Nr. 44, 46, 47, 48

Die Aggregabilität in cm² entspricht der Fläche unter der Aggregationskurve. Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; angegeben ist der Mittelwert aus den vier Meßwerten. Der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 % und 6 %.

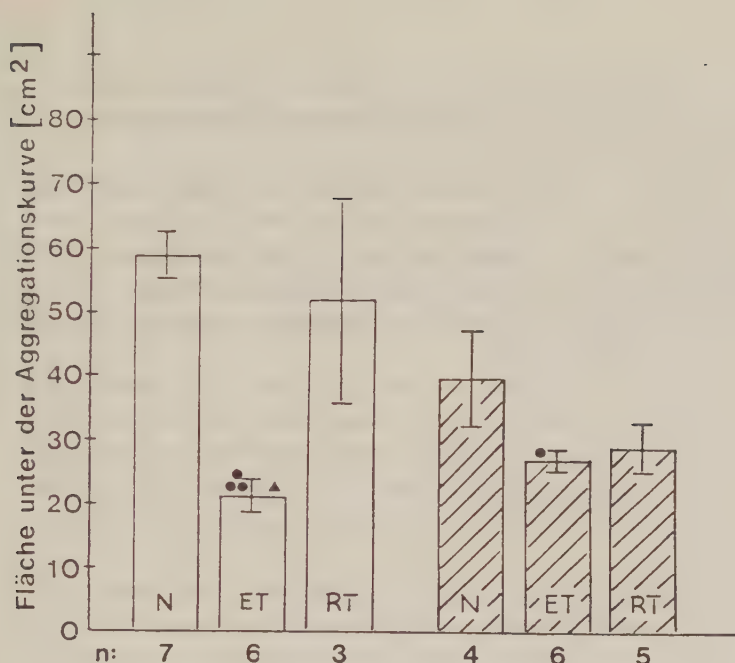


Abb.4 Kollagen-induzierte in-vitro Aggregation

Säulen geben die Fläche unter der Aggregationskurve nach 3 Minuten wieder (ohne Thrombozytenaggregationshemmer; siehe Tab.5; mit Thrombozytenaggregationshemmern, siehe Tab.6).

Durch vertikale Balken wird die Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt.

Kollagen-Konzentration: 0,1 µg/ml

N: Normalpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

n bezeichnet die Anzahl der statistisch ausgewerteten Meßwerte; die statistische Auswertung erfolgte nach dem un-gepaarten t-Test.

• $p < 0,05$; ••• $p < 0,0005$ (Vergleich zwischen N und ET)

▲ $p < 0,05$ (Vergleich zwischen ET und RT)

1.4 Aggregationen mit PAF als Aggregationsauslöser

In Vorversuchen mit Blut von Normalpersonen war $0,5 \times 10^{-6}$ M als diejenige Konzentration ermittelt worden, bei der eine reversible Aggregation ausgelöst wurde. Die Messungen, die bei dieser Konzentration durchgeführt wurden, ergaben allerdings in den untersuchten Patientengruppen durchaus auch irreversible Kurvenverläufe.

Die quantitative Auswertung der Kurven ergab für die Messungen ohne Medikamenteneinfluß wiederum eine statistisch hoch signifikant ($p < 0,0005$) schwächere Aggregabilität der Patienten mit ET im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen, deren Durchschnittswert 57% über dem der ET-Patienten lag (Tab.16 Seite 66; Abb.5).

Der Unterschied zu Patienten mit reaktiver Thrombozytose, die 18% unter dem Wert der Kontrollgruppe und 40% über dem Wert der Patienten mit ET lagen (Tab.16, Seite 66; Abb.5), war zwar etwas schwächer ausgeprägt, aber immer noch statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Unter dem Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente sank die Aggregabilität der gesunden Normalpersonen um 45% ab und glich sich damit fast vollständig dem Durchschnittswert der Patienten mit ET an, die mit Thrombozytenaggregationshemmern ein um 25% gesteigertes Aggregationsverhalten zeigten (Tab.16 und 17, Seite 66; Abb.5). Bei der PAF-induzierten Aggregation kommen also Thrombozytenaggregationshemmer ähnlich stark zum Tragen wie bei der Kollagen-induzierten Aggregation.

Der statistisch signifikante Unterschied ($p < 0,01$) zwischen ET-Patienten und Patienten mit reaktiver Thrombozytose, die 10% Steigerung ihrer Aggregabilität aufwiesen, blieb allerdings auch unter dem Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente erhalten (Tab.16 und 17, Seite 66; Abb.5).

Der Mittelwert aus den Messungen an zwei PV-Patienten unter

thrombozytenaggregationshemmender Therapie lag mit 39,4 cm² um 12% unter demjenigen für Patienten mit reaktiver Thrombozytose und 42%, bzw. 45% über demjenigen für die gesunden Kontrollpersonen und die Patienten mit ET.

Im Gegensatz zu den übrigen Aggregantien wies die Patientin mit CML (ohne Medikamente) mit 13,47 cm² eine ausgesprochen schwache Aggregationsantwort auf PAF als Stimulus auf.

KP	4	5	6	7	8	9	10	12	13		
Aggregabilität	34,05	52,40	51,34	64,16	47,35	57,3	69,52	37,51	35,23		
/ cm² /											
ET	19	20	21	22	23	24	RT	25	26	27	28
Aggregabilität	10,63	33,9	32,35	17,17	16,37	19,6	Aggregabilität	42,63	36,97	37,13	46,8
/ cm² /											
									/ cm² /		

Tabelle 12: In-vitro Aggregationen mit PAF - ohne Thrombozytenaggregationshemmer

PAF-Konzentration: $0,5 \times 10^{-6}$ M

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Alle drei Personengruppen nahmen derzeit keine thrombozytenaggregationshemmenden Medikamente ein.

Die Aggregabilität in cm² entspricht der Fläche unter der Aggregationskurve. Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; angegeben ist der Mittelwert aus den vier Meßwerten. Der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 % und 6 %.

KP	29	30	31	RT			
Aggregabilität	12,37	28,9	40,37	Aggregabilität	40,37	44,08	48
/ cm ² /				/ cm ² /	50,43		45,35

ET	36	37	38	39	40	41
Aggregabilität	21,28	20,53	49,77	9,9	37,12	24,35
/ cm ² /						

Tabelle 13: In-vitro Aggregationen mit PAF - mit Thrombozytenaggregationshemmern

PAF-Konzentration: $0,5 \times 10^{-6}$ M

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Folgende thrombozytenaggregationshemmenden Substanzen waren eingenommen worden:

Acetylsalicylsäure von: Person Nr. 29, 30, 32, 36, 41, 45

Acetylsalicylsäure + Dipyridamol von: Person Nr. 37, 38, 39, 40

Indometacin von: Person Nr. 46, 47, 48

Die Aggregabilität in cm² entspricht der Fläche unter der Aggregationskurve.

Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; angegeben ist der Mittelwert aus den 4 Meßwerten. Der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 % und 6 %.

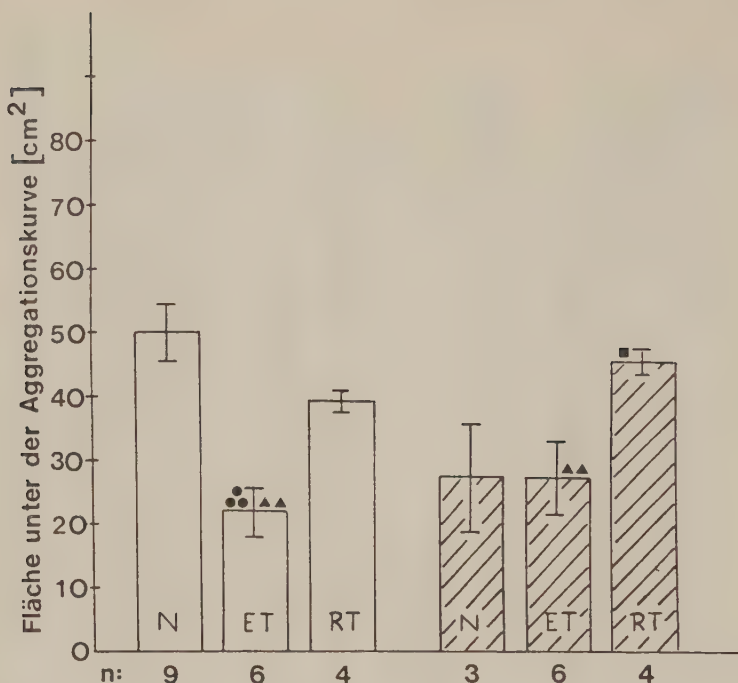


Abb.5 PAF-induzierte in-vitro Aggregation

Säulen geben die Fläche unter der Aggregationskurve nach 3 Minuten wieder (ohne Thrombozytenaggregationshemmer, siehe Tab.7; mit Thrombozytenaggregationshemmern, siehe Tab.8).

Durch vertikale Balken wird die Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt.

PAF-Konzentration: $0,5 \times 10^{-6} \text{M}$

N: Normalpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

n bezeichnet die Anzahl der statistisch ausgewerteten Meßwerte; die statistische Auswertung erfolgte nach dem ungepaarten t-Test.

••• $p < 0,0005$ (Vergleich zwischen N und ET)

▲▲ $p < 0,01$ (Vergleich zwischen ET und RT)

■ $p < 0,05$ (Vergleich zwischen N und RT)

1.5 Aggregationen mit Thrombin als Aggregationsauslöser

Auch bei Thrombin war angestrebt worden, die Messungen bei einer Thrombinkonzentration durchzuführen, die bei Normalpersonen eine reversible Aggregationsantwort hervorruft; als solche war in Vorversuchen eine Thrombinkonzentration von 0,05 U/ml ermittelt worden.

Bei den Messungen ohne Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern zeigten die Patienten mit ET keine Unterschiede im Aggregationsverhalten verglichen mit den gesunden Kontrollpersonen (Tab.16, Seite 66; Abb.6).

Unter dem Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente gab es starke Schwankungen zwischen den Einzelwerten des Kontrollkollektivs (Tab.15). Daher war trotz der deutlichen Differenz der Durchschnittswerte von ET-Patienten und Kontrollgruppe - der Wert für die ET-Patienten war um 40% geringer als der für das Normalkollektiv - keine klare Abgrenzung möglich (Tab.16, Seite 66; Abb.6).

Anders hingegen war die Situation bei Patienten mit reaktiver Thrombozytose: Bei der Thrombinkonzentration von 0,05 U/ml zeigten sie fast generell - ohne und mit thrombozytenaggregationshemmenden Medikamenten - eine derartig starke Aggregationsantwort, daß sich sofort oder nach geringer Latenzzeit nach Thrombinzugabe ein großes Aggregat bildete, das dann im Strahlengang des Photometers lag und die Transmission des Lichts schlagartig unter den festgelegten Nullpunkt absinken ließ. Es waren daher bei der gewählten Konzentration keine quantitativ auswertbaren Meßwerte für die Gruppe mit reaktiver Thrombozytose zu erreichen.

Erst bei Thrombin-Konzentrationen von 0,0025 U/ml, also 20-fach geringerer Konzentration ließen sich Aggregationen auslösen, die sich nicht mehr in klumpigen Aggregaten, sondern in einer gleichmäßigen Veränderung der optischen Dichte des plättchenreichen Plasmas äußerten. Diese waren allerdings eher schwach und zeigten einen irreversiblen Kurven-

verlauf.

Es war unmöglich, auch die anderen beiden Personengruppen bei solch niedrigen Thrombin-Konzentrationen zu untersuchen, da diese unterhalb einer Thrombin-Konzentration von 0,005 U/ml meist schon keine Aggregationsantwort mehr zeigten.

Mit einem Aggregabilitätswert von 69,2 cm² lag der eine Patient mit PV (unter thrombozytenaggregationshemmender Therapie), der mit dem Aggregans Thrombin gemessen werden konnte, weit über dem Durchschnitt des Kontrollkollektivs.

Die Patientin mit CML und hohen Thrombozytenzahlen verhielt sich wie die Patienten mit reaktiver Thrombozytose, ein Ausdruck der Hyperaggregabilität, die sie ja auch schon bei drei anderen aggregationsauslösenden Substanzen gezeigt hatte.

KP	1	3	5	6	7	8	11	12
Aggregabilität	17,6	12,92	7,3	45,7	21,85	8,75	12,15	17,11
/ cm ² /								
ET	19	20	21	23	24		RT	25
Aggregabilität	7,85	13,42	12,62	25,05	29,1		Aggregabilität	47,88
/ cm ² /							/ cm ² /	

Tabelle 14: In-vitro Aggregation mit Thrombin - ohne Thrombozytenaggregationshemmer

Thrombin-Konzentration: 0,05 U/ml

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patient mit Reaktiver Thrombozytose nach Splenektomie, der als Ausnahme bei 0,05 U/ml eine Aggregationsantwort zeigte, die sich planimetrisch auswerten ließ.

Alle drei Personengruppen nahmen derzeit keine thrombozytenaggregationshemmenden Medikamente ein.

Die Aggregabilität in cm² entspricht der Fläche unter der Aggregationskurve. Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; angegeben ist der Mittelwert aus vier Meßwerten. Der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 % und 6 %.

KP	30	31	32	RT	45		
Aggregabilität	19,17	64,87	19,2	Aggregabilität	9,52		
/ cm ² /				/ cm ² /			
ET	35	36	37	39	40	41	42
Aggregabilität	17,85	16,07	12,6	34,12	22,4	16,3	22,87
/ cm ² /							

Tabelle 15: In-vitro Aggregation mit Thrombin - mit Thrombozytenaggregationshemmern

Thrombin-Konzentration: 0.05 U/ml

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patientin mit Reaktiver Thrombozytose bei V. a. Arteriitis, die als Ausnahme bei 0,05 U/ml eine Aggregationsantwort zeigte, die sich planimetrisch auswerten ließ.

Folgende thrombozytenaggregationshemmenden Substanzen waren eingenommen worden:

Acetylsalicylsäure von: Person Nr. 30, 32, 36, 41, 45

Acetylsalicylsäure + Dipyridamol von: Person Nr. 31, 35, 37, 39, 40, 42

Die Aggregabilität in cm² entspricht der Fläche unter der Aggregationskurve. Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; angegeben ist der Mittelwert aus den vier Meßwerten. Der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 % und 6 %.

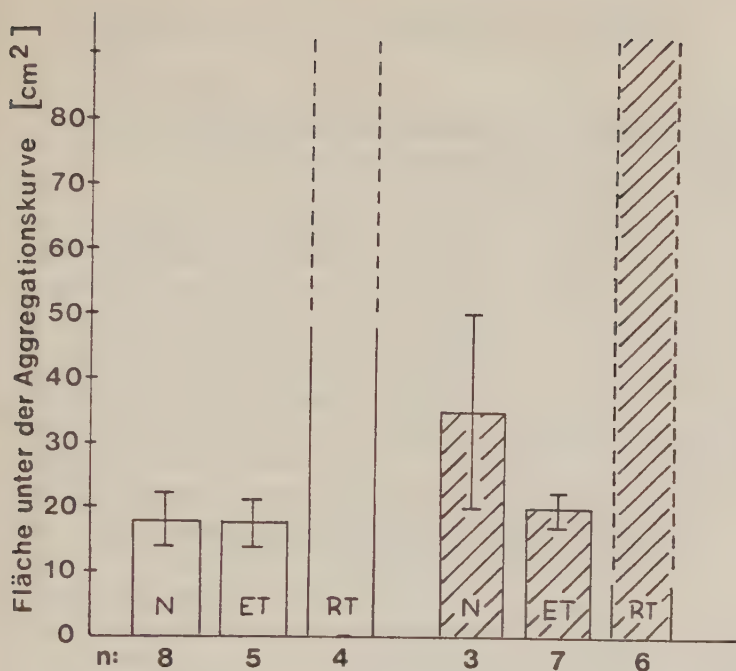


Abb.6 Thrombin-induzierte in-vitro Aggregation

Säulen geben die Fläche unter der Aggregationskurve nach 3 Minuten wieder (□ ohne Thrombozytenaggregationshemmer, siehe Tab.9; ▨ mit Thrombozytenaggregationshemmern, siehe Tab.10).

Die nach oben offenen, gestrichelten Säulen bei den Patienten mit Reaktiver Thrombozytose sollen die Hyperaggregabilität dieser Gruppe demonstrieren.

Durch vertikale Balken wird die Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt.

Thrombin-Konzentration: 0,05 U/ml

N: Normalpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

n bezeichnet die Anzahl der statistisch ausgewerteten Meßwerte; nach dem ungepaarten t-Test ergab sich keine statistische Signifikanz.

Tabelle 16: Aggregationstests bei Patienten bzw. Kontroll-
personen ohne Thrombozytenaggregationshemmer

	KP	ET	RT
Adrenalin	18.11 $\pm$ 1.3	8.63 $\pm$ 1.0	40.42 $\pm$ 5.0
(0.01 μ g/ml)	(n = 10)	(n = 6)	(n = 4)
ADP (0.01 μ M)	46.26 $\pm$ 3.1	28.32 $\pm$ 1.6	63.74 $\pm$ 15.4
	(n = 11)	(n = 6)	(n = 4)
Kollagen	58.57 $\pm$ 3.5	20.77 $\pm$ 2.5	52.09 $\pm$ 16.2
(0.01 μ g/ml)	(n = 7)	(n = 6)	(n = 3)
PAF (0.5 10^{-6} M)	49.87 $\pm$ 4.2	21.67 $\pm$ 3.8	40.89 $\pm$ 2.4
	(n = 9)	(n = 6)	(n = 4)
Thrombin	17.89 $\pm$ 4.3	17.61 $\pm$ 4.0	$\rightarrow \infty$
(0.05 U/ml)	(n = 8)	(n = 5)	(n = 4)

Tabelle 17: Aggregationstest bei Patienten bzw. Kontroll-
personen mit Thrombozytenaggregationshemmern

	KP	ET	RT
Adrenalin	28.37 $\pm$ 2.5	10.21 $\pm$ 0.9	47.85 $\pm$ 9.5
(0.01 μ g/ml)	(n = 4)	(n = 8)	(n = 4)
ADP (0.01 μ M)	65.33 $\pm$ 11.2	33.68 $\pm$ 3.5	25.49 $\pm$ 7.3
	(n = 3)	(n = 5)	(n = 4)
Kollagen	40.0 $\pm$ 7.5	27.01 $\pm$ 1.5	28.77 $\pm$ 3.6
(0.1 μ g/ml)	(n = 4)	(n = 6)	(n = 5)
PAF (0.5 10^{-6} M)	27.21 $\pm$ 8.1	21.16 $\pm$ 5.7	45.06 $\pm$ 2.0
	(n = 3)	(n = 6)	(n = 4)
Thrombin	34.41 $\pm$ 15.2	20.32 $\pm$ 2.6	$\rightarrow \infty$
(0.05 U/ml)	(n = 3)	(n = 7)	(n = 6)

Zusammenfassung des Aggregationsverhaltens dreier Versuchs-
gruppen unter verschiedenen Aggregationsauslösern

Es werden Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwerts der Aggregabilität in den untersuchten Personengruppen aufgeführt.

n bedeutet die Anzahl der statistisch ausgewerteten Personen innerhalb einer Gruppe.

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Zum Medikamenteneinfluß siehe Tabellen 7, 9, 11, 13, 15

1.6 Dosisabhängigkeit der Adrenalin-induzierten Aggregationsantwort

Die Tatsache, daß die untersuchten ET-Patienten in ihrer Reaktion auf Adrenalin als Aggregationsauslöser besonders ausgeprägt von den anderen untersuchten Personengruppen abwichen, gab den Anlaß zu prüfen, ob vielleicht höhere Adrenalinkonzentrationen bei ET-Patienten Aggregationsantworten normalen Ausmaßes hervorrufen könnten.

Die Aggregationsreaktion wurde bei unterschiedlichen Adrenalinkonzentrationen gemessen - allerdings im weniger sensitiven 50 mV-Meßbereich, um auch starke Aggregationsreaktionen bei hohen Adrenalinkonzentrationen erfassen zu können; bei allen anderen Aggregationsmessungen war die maximale Spannungsänderung auf 20 mV festgelegt worden.

Bei der höchsten Adrenalinkonzentration von 0,1 mg/ml zeigten die drei Versuchsgruppen generell submaximale Aggregationen, die sich jedoch in ihrem Ausmaß deutlich unterschieden: Bei den Messungen ohne Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern lagen die Patienten mit ET 63% unter, die Patienten mit reaktiver Thrombozytose 14% über dem Durchschnitt der gesunden Kontrollpersonen (siehe Tab.18; Abb.7); die Patienten mit ET unterschieden sich also statistisch hochsignifikant ($p < 0,0005$) von den anderen beiden Versuchsgruppen. Dasselbe Signifikanzniveau von $p < 0,0005$ ergab sich im Vergleich der ET-Gruppe mit dem Normal-, bzw. RT-Kollektiv auch bei allen Adrenalinkonzentrationen bis einschließlich 0,01 µg/ml.

Bei einer Adrenalinkonzentration von 10 µg/ml zeigten die Patienten-Gruppen, d.h. das ET- und RT-Kollektiv, jeweils maximale Aggregationsantworten; die Gruppe der gesunden Normalpersonen lag nur unwesentlich unter ihrem maximalen Aggregationswert, der bei einer Adrenalinkonzentration von 1 µg/ml erreicht wurde. Während die Patienten mit reaktiver Thrombozytose bei 10 µg/ml im Bereich, bei 1 µg/ml 10% unter

der Kontrollgruppe lagen, war der Aggregabilitätswert der ET-Patienten um 47% (bei 10 $\mu\text{g/ml}$), bzw. um 65% (bei 1 $\mu\text{g/ml}$) geringer als derjenige des Normalkollektivs.

Am deutlichsten stellte sich dieser Unterschied bei einer AdrenalinKonzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dar: der Aggregabilitätswert der ET-Patienten lag 83% unter dem Wert des Normalkollektivs, bzw. 80% unter dem des RT-Kollektivs (siehe Tab. 18; Abb.7).

0,01 $\mu\text{g/ml}$ war die AdrenalinKonzentration, bei der die Aggregationsversuche im 20 mV-Meßbereich durchgeführt worden waren. Die dort gewonnenen Ergebnisse ließen sich erwartungsgemäß bestätigen: Mit einem Aggregabilitätswert, der 43% über demjenigen des Normalkollektivs lag, zeigten sich die untersuchten Patienten mit reaktiver Thrombozytose "hyperaggregabel", wohingegen die ET-Patienten nur 35% des Aggregabilitätswerts der gesunden Kontrollpersonen erreichten (siehe Tab.18; Abb.7).

Die Aggregationsantwort bei einer AdrenalinKonzentration von 0,001 $\mu\text{g/ml}$, die bei einigen Personen aus allen Personen-Gruppen geprüft wurde, war äußerst gering ausgeprägt, bzw. nicht meßbar (siehe Abb.7 und Abb.8).

Bei den Messungen, die unter dem Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern ausgeführt wurden ergab sich beim Vergleich der gesunden Kontrollpersonen und der Patienten mit reaktiver Thrombozytose ein nicht ganz so einheitliches Bild (siehe Abb.8). Zwar blieb der Unterschied im Aggregationsverhalten zwischen Patienten mit reaktiver Thrombozytose und Patienten mit ET über den gesamten Konzentrationsbereich erhalten: bei 0,1 mg/ml lagen die ET-Patienten um 70% ($p < 0,0025$), bei 10 $\mu\text{g/ml}$ um 71% ($p < 0,0005$), bei 1 $\mu\text{g/ml}$ um 72% ($p < 0,0005$), bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ um 66% ($p < 0,0025$) und bei 0,01 $\mu\text{g/ml}$ um 72% unter der Patientengruppe mit reaktiver Thrombozytose. Auch die untersuchten Normalpersonen reagierten durchweg deutlich stärker als die ET-Patienten: bei 0,1 mg/ml um 64% ($p < 0,0005$), bei 10 $\mu\text{g/ml}$ um 59% ($p < 0,05$), bei 1 $\mu\text{g/ml}$ um 70% ($p < 0,01$), bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ um 76% ($p < 0,01$), bei 0,01

$\mu\text{g/ml}$ um 57% ($p < 0,05$); aber die Differenz der Aggregabilitätswerte für die Patienten mit reaktiver Thrombozytose und das untersuchte Normalkollektiv schwankte bei den verschiedenen Konzentrationen doch erheblich: während die Patienten mit reaktiver Thrombozytose bei der Konzentration von 0,1 mg/ml 17% und bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 30% unter den Kontrollpersonen lagen, boten sie bei 10 $\mu\text{g/ml}$ um 30%, bei 1 $\mu\text{g/ml}$ um 6% höhere Werte. Bei der Adrenalinkonzentration von 0,01 $\mu\text{g/ml}$ zeigten sich die Patienten mit reaktiver Thrombozytose ebenfalls als aggregationsfreudiger und lagen um 53% über den Kontrollpersonen (siehe Tab.19: Abb.8).

Adrenalin-Konzentration					
	0,1 mg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01 µg/ml
KP 3	33,66	41,56	50,13	48,37	8,14
KP 5	18,95	39,37	48,34	45,55	10,2
KP 6	35,17	60,67	59,82	48,25	11,07
KP 8	17,17	40,15	40,27	37,15	10,07
KP 9	30,37	55,07	55,97	36,5	9,17
KP 10	26,97	40,62	42,2	29,27	6,67
KP 11	22,95	54,57	51,32	36,2	5,27
KP 12	20,1	34,37	34,3	20,5	6,25
KP 13	22,77	64,12	62,32	55,85	5,82
$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$	25,35 $\pm$ 2,2	46,67 $\pm$ 3,2	49,41 $\pm$ 3,0	39,74 $\pm$ 4,0	8,07 $\pm$ 0,7
ET 20	8,97	32,15	15,47	5,85	0,6
ET 21	11,72	18,1	17,5	9,8	1,77
ET 22	11,27	31,62	16,91	7,0	2,54
ET 23	7,7	16,32	13,77	4,23	4,3
ET 24	6,82	23,92	20,6	6,6	4,97
$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$	9,3 $\pm$ 1,0	24,42 $\pm$ 3,3	16,84 $\pm$ 1,5	6,62 $\pm$ 1,2	2,84 $\pm$ 0,8
RT 25	32,05	68,64	54,58	49,19	10,52
RT 26	26,05	37,67	39,6	33,92	13,22
RT 27	31,4	37,86	39,3	30,0	14,85
RT 28	26,03	49,58	51,53	23,15	7,68
$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$	28,88 $\pm$ 1,7	48,44 $\pm$ 7,3	46,25 $\pm$ 3,9	34,07 $\pm$ 5,5	11,57 $\pm$ 1,6

Tabelle 18: Aggregationsverhalten dreier Versuchsgruppen bei unterschiedlichen AdrenalinKonzentrationen - ohne Thrombozytenaggregationshemmer

Die Zahlenwerte geben die Fläche unter der Aggregationskurve wieder. Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet, der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 % und 6 %.

KP. Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Alle drei Personengruppen nahmen derzeit keine thrombozytenaggregationshemmenden Medikamente ein.

$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$ bedeutet der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts in den untersuchten Personengruppen.

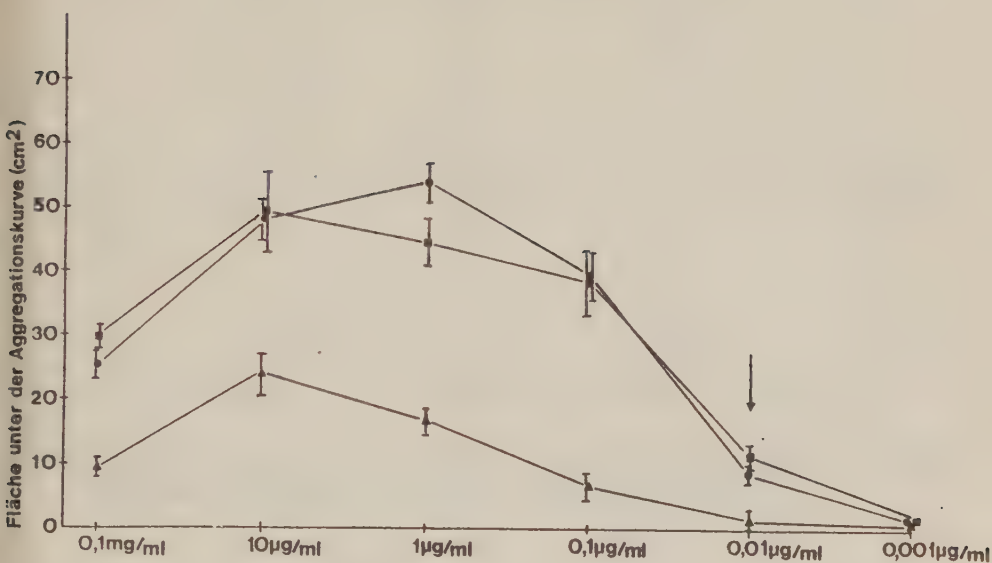


Abb.7 In-vitro Aggregationen bei unterschiedlichen Adrenalin-
endkonzentrationen - ohne Thrombozytenaggregationshemmer

Es wird die durchschnittliche Fläche unter der Aggregationskurve nach 3 Minuten bei den einzelnen Adrenalinendkonzentrationen dargestellt. Durch vertikale Balken wird die Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt.

- Gesunde Kontrollpersonen
- ▲ Patienten mit essentieller Thrombozythämie
- Patienten mit reaktiver Thrombozytose

Keine der untersuchten Personen nahm derzeit thrombozytenaggregationshemmende Medikamente ein.

Der Pfeil markiert die Adrenalin-Konzentration von 0.01 µg/ml bei der auch im 20 mV-Meßbereich in-vitro Aggregationen durchgeführt wurden.

Adrenalin-Konzentration

	0,1 mg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01 µg/ml
KP 31	43,52	40,32	68,37	68,3	6,35
KP 32	33,2	37,7	33,25	24,3	10,92
$\bar{X}$	38,36	39,01	50,81	36,3	8,63
ET 37	14,46	21,66	20,31	8,51	4,64
ET 39	12,6	26,6	23,76	10,22	0,7
ET 40	4,45	13,35	8,45	5,4	1,12
ET 41	7,35	11,55	11,25	12,07	7,27
ET 42	9,0	12,22	10,65	6,22	4,26
$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$	$9,57 \pm 1,8$	$15,93 \pm 3,6$	$14,88 \pm 3,0$	$8,48 \pm 1,2$	$3,7 \pm 1,2$
RT 43	14,82	77,0	77,87	38,05	20,8
RT 44	47,82	59,57	41,15	17,62	4,3
RT 45	27,25	30,95	49,38	19,2	15,15
RT 46	40,98	51,23	57,23	31,2	19,08
RT 47	28,8	58,18	44,10	19,08	6,88
$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$	$31,95 \pm 5,7$	$55,39 \pm 7,4$	$53,95 \pm 6,5$	$25,03 \pm 4,0$	$13,24 \pm 3,3$

Tabelle 19: Aggregationsverhalten dreier Personengruppen mit Thrombozytenaggregationshemmern bei unterschiedlichen Adrenalin-Konzentrationen

Die Zahlenwerte geben die Fläche unter der Aggregationskurve wieder. Jede Kurve wurde 4-fach planimetrisch ausgewertet; der relative Fehler der Flächenbestimmung lag zwischen 0,4 % und 6 %.

$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$ bedeutet der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts in den untersuchten Personengruppen.

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Folgende thrombozytenaggregationshemmenden Substanzen waren eingenommen worden:

Acetylsalicylsäure von: Person Nr. 32, 41, 45

Acetylsalicylsäure + Dipyridamol von: Person Nr. 31, 37, 39, 40, 42, 43

Indometacin von: Person Nr. 44, 46, 47

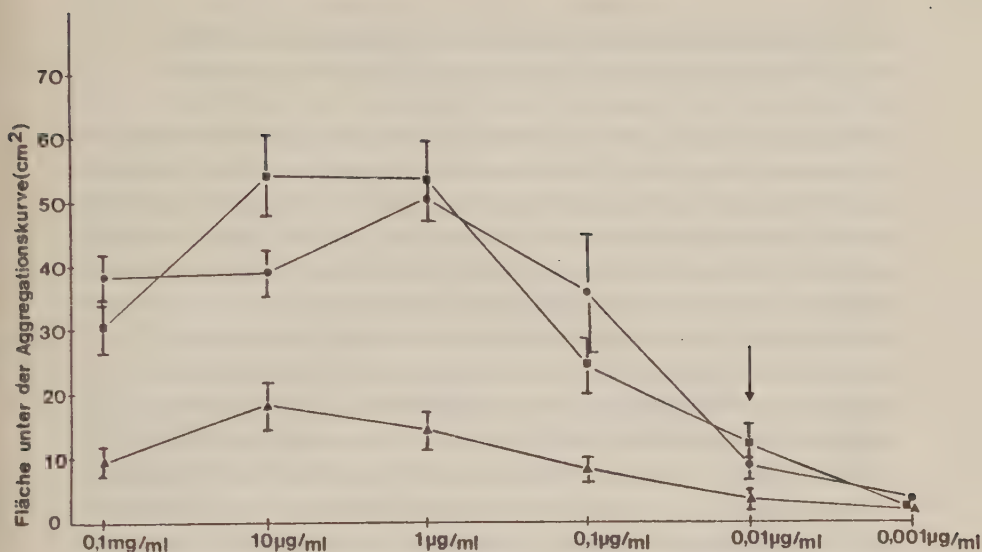


Abb.8 In-vitro Aggregationen bei unterschiedlichen Adrenalin-
endkonzentrationen - mit Thrombozytenaggregationshemmern

Es wird die durchschnittliche Fläche unter der Aggregationskurve nach 3 Minuten bei den einzelnen Adrenalinendkonzentrationen dargestellt. Durch vertikale Balken wird die Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt.

- Gesunde Kontrollpersonen
- ▲ Patienten mit essentieller Thrombozythämie
- Patienten mit reaktiver Thrombozytose

Zu den thrombozytenaggregationshemmenden Substanzen siehe Tab. 19.

Der Pfeil markiert die Adrenalin-Konzentration von 0.01 µg/ml bei der auch im 20 mV-Meßbereich in-vitro Aggregationen durchgeführt wurden.

1.7 Aggregationsantwort von ET-Thrombozyten auf Adrenalin nach Vorinkubation mit Normal-PFP

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob das abgeschwächte Aggregationsverhalten bei ET-Patienten auf eine aggregationshemmende Substanz im Plasma zurückzuführen ist, wurde untersucht, ob die Verwendung von Normal-PFP anstelle des Patienten-PFP zur Einstellung der Thrombozytenzahl auf 300.000/ μ l eine Verbesserung der Aggregationsantwort bewirke.

Die Eichung des Schreibers erfolgte hierbei mit dem PFP der Normalperson; daher wurde der Aggregabilitätswert bei dieser Messung auch nicht auf denjenigen des Patienten bei der Aggregation im Eigen-PFP bezogen, sondern auf den entsprechenden Wert der Normalperson. Die in-vitro Aggregationen wurden bei einer Adrenalin-Konzentration von 10 μ g/ml im 50 mV-Meßbereich des Schreibers durchgeführt.

PRP des Patienten Nr.18 mit PFP von vier Normalpersonen (Nr.6, 8, 10, 12) erbrachte Aggregationskurven, die sich in ihrem Ausmaß teilweise erheblich von der Bezugskurve unterschieden. Mit PFP Nr.10 ergab sich eine um 64%, mit PFP Nr.12 eine um 40% geringere Aggregationsantwort als bei Verwendung des Normal-PRPs; bei den Tests mit PFP Nr.6 ließ sich keine Veränderung, bei denjenigen mit PFP Nr.8 sogar eine 47%ige Steigerung des Aggregationsausmaßes feststellen.

Auch die Versuche mit dem PRP anderer ET-Patienten erbrachten divergierende Ergebnisse: PRP der Patientin Nr.36 mit PFP der Normalperson Nr.30 ließ eine 56%ige Hemmung der Aggregationsantwort, Patienten-PRP Nr.39 mit Normal-PFP Nr.31 dagegen eine 47%ige Steigerung der Aggregation erkennen. Bei den Versuchen mit Patienten-PRP Nr.40 und Normal-PFP Nr.33 ergab sich wiederum eine deutliche Abschwächung des Aggregationsverhaltens um 90%.

Es läßt sich also bei 4 von 7 durchgeführten Kreuzproben eine Abschwächung der Adrenalin-induzierten Aggregation durch Einsatz von "ET-Thrombozyten" anstelle der Eigen-

Thrombozyten in normalem, plättchenfreiem Plasma feststellen, während zwei Kreuzproben ein widersprüchliches Ergebnis erbrachten. Dabei ist allerdings bei der Kreuzprobe von PRP₃, und PFP₃ zu bedenken, daß im Rahmen der Adrenalin- und ADP-induzierten Aggregationen das PRP₃ selbst unter dem Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern die stärkste Aggregationsantwort von allen untersuchten Normalpersonen erkennen ließ, was möglicherweise auf erhöhte Spiegel einer Serumkomponente zurückzuführen ist, die über einen anderen Mechanismus als die eingesetzten Aggregantien noch zusätzlich aggregierend auf die Thrombozyten wirkt (vgl. dazu Tabelle 7 und Tabelle 9). Dies würde z.B. auf Thrombin zutreffen, worauf die "ET-Thrombozyten" ja Aggregationsantworten normalen Ausmaßes zeigen. Da die Thrombinspiegel allerdings nicht bestimmt wurden, kann zu diesem Punkt keine definitive Aussage gemacht werden.

Das abgeschwächte Aggregationsverhalten der ET-Plättchen scheint wohl schon ein stabiles Charakteristikum der Plättchen selbst zu sein. Auch Literaturbefunde (O'Brien, 1964) zeigen, daß eine Adrenalinresistenz nicht durch Zusatz Adrenalin-sensitiven Plasmas aufgehoben werden kann.

1.8 Aggregationsverhalten eines ET-Patienten ohne und mit thrombozytenaggregationshemmender Therapie

Es gelang nur beim Patienten Nr.18 (Beschreibung siehe "Personen") in-vitro Aggregationen mit verschiedenen Aggregationsauslösern ohne (d.h. nach einem medikamentenfreien Intervall von 14 Tagen) und unter thrombozytenaggregationshemmender Therapie (Colfarit® 1-O-O) zu vergleichen.

Es ergaben sich nur geringfügige Unterschiede in den Aggregabilitätswerten:

Bei Adrenalin (0,01 µg/ml): 7,1 cm² (ohne Therapie) gegenüber 7,7 cm² (mit Therapie)

Bei ADP (0,01 µM): 25,8 cm² (ohne Therapie) gegenüber 21,9 cm²

(mit Therapie)

Bei Kollagen (0,1 $\mu\text{g/ml}$): 16,3 cm^2 (ohne Therapie) gegenüber 14,9 cm^2 (mit Therapie)

Bei PAF (0,5 $\times 10^{-6}$ M): 27,9 cm^2 (ohne Therapie) gegenüber 26,0 cm^2 (mit Therapie)

Bei Thrombin (0,05 U/ml): 9,4 cm^2 (ohne Therapie) gegenüber 11,2 cm^2 (mit Therapie)

Die thrombozytenaggregationshemmende Medikation, die ja klinisch durchaus die Symptomatik der Erkrankung verbessern kann (Vreeken & van Aken, 1971), bei dem Patienten die mikroembolischen Komplikationen der ET allerdings nicht völlig beseitigte, wirkte sich in diesen in-vitro Untersuchungen nicht in solchem Maße aus, daß eine klare Abgrenzung der Werte zu denen der Kontrollkollektive unmöglich geworden wäre.

2. Messung der basalen cAMP-Spiegel in Thrombozyten

Die Hypothese, daß erhöhte cAMP-Spiegel die Thrombozytenaggregation hemmen können (Marcus & Zucker, 1965), ist in den letzten Jahren immer wieder bestätigt worden (Salzman & Levine, 1971; Malmsten et al., 1976; Tateson et al., 1977; Fitzpatrick et al., 1979); allerdings scheinen erhöhte cAMP-Spiegel in den Thrombozyten keine notwendige Bedingung für eine abgeschwächte Aggregationsantwort darzustellen (Tsien et al., 1982).

Die basalen cAMP-Spiegel wurden gemessen, um zu prüfen, ob das abgeschwächte Aggregationsverhalten der Patienten mit ET eventuell auf erhöhte cAMP-Spiegel zurückzuführen sei.

Die Meßergebnisse sprechen allerdings nicht für diese Hypothese: der Vergleich zwischen Patienten mit ET ohne Thrombozytenaggregationshemmer und gesunden Kontrollpersonen ergab sogar einen gerinfügig niedrigeren Durchschnittswert (um 17%) für die Patientengruppe (siehe Tab. 20).

Statistisch hoch signifikant ($p < 0,0025$) war der Unterschied zwischen ET-Patienten ohne und mit thrombozytenaggregationshemmender Therapie: Patienten, die Thrombozytenaggregationshemmer einnahmen, zeigten im Durchschnitt um 43% niedrigere basale cAMP-Spiegel als die Patienten ohne diese Medikamente.

Zwei Patienten mit reaktiver Thrombozytose, die thrombozytenaggregationshemmende Substanzen (Acetylsalicylsäure + Dipyridamol; Indometacin) einnahmen, lagen im Bereich der ET-Patienten unter thrombozytenaggregationshemmender Therapie (siehe Tab. 20).

Aus dem Bereich der myeloproliferativen Erkrankungen waren auch noch zwei Patienten mit PV und die bereits erwähnte Patientin mit CML und hohen Thrombozytenzahlen auf ihre basalen cAMP-Spiegel hin untersucht worden: Beide PV-Patienten nahmen zwar Thrombozytenaggregationshemmer ein, doch lagen die basalen cAMP-Spiegel eines Patienten (Einnahme von:

Acetylsalicylsäure + Dipyridamol, Reserpin + Clopamid + Dihydroergocristinmethansulfonat, Pentoxifyllin) mit 33,8 pmol cAMP/mg Thrombozytenprotein durchaus im Bereich der untersuchten Personen ohne Thrombozytenaggregationshemmer. Der andere Patient (Einnahme von: Nifedipin, Acetylsalicylsäure, Atenolol, Pentoxifyllin, Allopurinol) hingegen bot einen Wert von 20,45 pmol/mg Thrombozytenprotein, der sich den Werten der Gruppe zuordnen läßt, die thrombozytenaggregationshemmende Medikamente einnahm.

Besonders niedrig (13,35 pmol cAMP/mg Thrombozytenprotein) waren die basalen cAMP-Spiegel bei der Patientin mit CML, obwohl diese zum Zeitpunkt der Untersuchung keinerlei Medikamente einnahm.

Die steigernde Wirkung von Prostazyklin auf den cAMP-Gehalt von Thrombozyten (Siegl et al., 1979) wird deutlich am Wert eines Patienten (Nr.49) mit reaktiver Thrombozytose, der außer mit Acetylsalicylsäure auch noch mit Prostazyklin i.v. (tägliche Dosis 15 ng/kgKörpergewicht) zur Thrombozytenaggregationshemmung therapiert wurde. Er lag mit einem Wert von 146,2 pmol cAMP/mg Thrombozytenprotein weit über allen anderen gemessenen Werten. Mit diesem hohen cAMP-Gehalt der Thrombozyten waren erwartungsgemäß gegenüber den übrigen Patienten mit reaktiver Thrombozytose stark abgeschwächte Aggregationsantworten auf alle verwendeten Aggregentien korreliert (auf Adrenalin: 14,17 cm²; auf ADP: 10,22 cm²; auf Kollagen: 20,8 cm²; auf PAF: 10,95 cm²; auf Thrombin: 20,42 cm²).

Dieser Meßwert zeigt auch, daß bei der durchgeführten Methode Probleme, die oft bei der cAMP-Bestimmung auftauchen, nicht auftraten: da die basalen thrombozytären cAMP-Spiegel nämlich sehr niedrig sind und 70% des im PRP vorhandenen cAMP extrazellulär lokalisiert ist (Haslam, 1975), hat man mit einem ständigen Verlust von cAMP aus den Thrombozyten zu rechnen. Dies hat zur Folge, daß sich in-vivo Unterschiede durch die Messung häufig gar nicht mehr erfassen lassen. Dies war bei der angewendeten Meßmethode nicht der Fall; die

Tatsache, daß bei den Messungen kein Unterschied in den thrombozytären cAMP-Gehalten zwischen unbehandelten Normalpersonen und unbehandelten ET-Patienten, bzw. generell keine Erhöhung der cAMP-Spiegel in ET-Plättchen festgestellt wurde, stellt also kein Artefakt dar.

KP		ET		RT			
Nr.	-	Nr.	-	Nr.	+	Nr.	+
4	36,25	20	30,5	36	18,75	43	19,5
14	43,05	22	30,5	37	23,9	44	18,05
15	32,45	23	25,5	38	9,65		
16	43,37	24	35,5	39	22,0		
17	37,00			40	13,2		
				41	20,1		
$\bar{X} \pm$ S.E.M.	$38,42 \pm$	$\bar{X} \pm$ S.E.M.	$31,83 \pm$	$\bar{X} \pm$ S.E.M.	$17,93 \pm$	$\bar{X}$	18,77
	2,1		2,4		2,2		

Tabelle 20: Basale Spiegel des zyklischen Adenosinmonophosphats in Thrombozyten

Die Zahlenwerte geben pmol cAMP/mg Thrombozyten-Protein an (+ mit Thrombozytenaggregationshemmern; - ohne Thrombozytenaggregationshemmer). Mindestens 2 Nucleotidbestimmungen wurden gemittelt.

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Folgende thrombozytenaggregationshemmenden Substanzen waren eingenommen worden:

Acetylsalicylsäure von: Person Nr. 36, 41

Acetylsalicylsäure + Dipyridamol von: Person Nr. 37, 38, 39, 40, 43

Indometacin von: Person Nr. 44

$\bar{X} \pm$ S.E.M. bedeutet der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts innerhalb der einzelnen Personengruppen.

3. Bestimmung der Plasmakonzentration von Fibrinogen- und α_1 -saurem Glykoprotein

3.1 Fibrinogen-Konzentration im Plasma

Fibrinogen ist ein essentieller Kofaktor für die Aggregation der Thrombozyten nach Adrenalin- oder ADP-zugabe; denn gewaschene oder Gel-filtrierte Thrombozytensuspensionen, die kein Fibrinogen mehr enthalten, bzw. Thrombozyten von afibrinogenämischen Patienten aggregieren nicht nach Adrenalin- oder ADP-Zugabe (Tangen et al., 1973; Weiss, 1975).

Um zu klären, ob die abgeschwächte Aggregationsantwort bei ET-Patienten vielleicht durch Veränderungen der Fibrinogenkonzentration im Plasma mitverursacht würde, wurden die Plasmaspiegel dieses Proteins bestimmt.

Diese Annahme wurde durch die Messungen nicht bestätigt: Im Durchschnitt lagen die Durchmesser des Präzipitatrings bei den ET-Patienten ohne thrombozytenaggregationshemmende Medikamente um 10%, bei denjenigen ET-Patienten, die solche Medikamente einnahmen, um 20% über dem Durchschnittswert des entsprechenden Kontrollkollektivs aus gesunden Normalpersonen (siehe Tab. 21 und 22; Abb. 9).

Im Vergleich zu Patienten mit reaktiver Thrombozytose ergaben sich bei den untersuchten ET-Patienten ohne und mit thrombozytenaggregationshemmender Therapie niedrigere Fibrinogenkonzentrationen: Die Durchmesser der Präzipitatrings waren sowohl bei den Messungen ohne, als auch denen mit Thrombozytenaggregationshemmern um 19% geringer als bei den jeweiligen Gruppen mit reaktiver Thrombozytose (siehe Tab. 21 und 22; Abb. 9). So ließ sich lediglich bei den Patienten mit reaktiver Thrombozytose die verglichen mit den beiden anderen Gruppen stärkste Aggregationsneigung mit den höchsten Fibrinogenkonzentrationen im Plasma korrelieren.

Die Bestimmung des Präzipitatringdurchmessers bei drei Patienten mit PV, die Thrombozytenaggregationshemmer einnahmen, ergab einen Mittelwert von 6,07 mm $\pm 0,8$ ($\bar{x} \pm S.E.M.$), der sich nur unwesentlich von dem der ET-Patienten unter derartiger Therapie unterschied.

Mit einem Präzipitatringdurchmesser von 6,12 mm befand sich auch die Patientin mit CML und hohen Thrombozytenzahlen, die keine Thrombozytenaggregationshemmer einnahm, im Streubereich der entsprechenden Gruppe von ET-Patienten.

KP	4	5	6	7	8	9	10	12	$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$
Durchmesser des Präzipi- tatrings / mm /	5,89	5,26	5,64	5,12	5,32	6,38	5,37	5,17	$5,52 \pm 0,1$
Plasmakonzen- tration / g/l /	2,86	1,97	2,50	1,83	2,08	3,57	2,15	1,89	$2,36 \pm 0,2$

RT	19	20	21	22	23	24	$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$	RT	25	26	27	28	$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$
Durchmesser des Präzipi- tatrings / mm /	5,37	7,07	6,07	5,88	5,03	6,7	$6,07 \pm 0,3$	Durchmesser des Präzipi- tatrings / mm /	6,87	8,62	6,95	7,51	$7,49 \pm 0,4$
Plasmakon- zentration / g/l /	2,18	4,73	3,15	2,86	1,68	4,07	$3,11 \pm 0,5$	Plasmakon- zentration / g/l /	4,34	7,6	4,47	5,45	$5,47 \pm 0,8$

Tabelle 21: Fibrinogen-Konzentration im Plasma - ohne Thrombozytenaggregationshemmer

KP: Gesunde Kontrollpersonen

RT: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Alle drei Personengruppen nahmen derzeit keine thrombozytenaggregationshemmenden Medikamente ein.

Aufgeführt ist der Mittelwert aus der 6-fachen Ausmessung jedes Präzipitatrings; der relative Fehler bei der Bestimmung des Durchmessers betrug ca. 1 %.
 $\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$ bedeutet der Mittelwert der aufgeführten Durchmesser und die Standardabweichung des Mittelwerts in den unterschiedlichen Personengruppen.

KP	29	31	33	$\bar{X} \pm S.E.M.$	RT	43	44	45	46	47	$\bar{X} \pm S.E.M.$
Durchmesser des Präzipitatriangs / mm /	5,34	5,35	3,64	$4,78 \pm 0,6$	Durchmesser des Präzipitatriangs / mm /	6,2	8,25	7,62	8,62	5,74	$7,29 \pm 0,5$
Plasmakonzentration / g/l /	2,1	2,11	0,25	$1,49 \pm 0,6$	Plasmakonzentration / g/l /	3,29	6,85	5,65	7,6	2,64	$5,21 \pm 0,9$

ET	36	37	38	$\bar{X} \pm S.E.M.$	42	$\bar{X} \pm S.E.M.$
Durchmesser des Präzipitatriangs / mm /	6,53	6,34	7,25	$5,46 \pm 0,4$	5,19	$5,96 \pm 0,4$
Plasmakonzentration / g/l /	3,8	3,5	4,99	2,26	1,68	$3,02 \pm 0,5$

Tabelle 22: Fibrinogen-Konzentration im Plasma - mit Thrombozytenaggregationshemmern

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Folgende thrombozytenaggregationshemmende Substanzen waren eingenommen worden:

Acetylsalicylsäure von: Person Nr. 29, 35, 45

Acetylsalicylsäure + Dipyridamol von: Person Nr. 31, 33, 37, 38, 39, 40, 42, 43

Indometacin von: Person Nr. 44, 46, 47

Aufgeführt ist der Mittelwert aus der 6-fachen Ausmessung jedes Präzipitatriangs; der relative Fehler bei der Bestimmung des Durchmessers betrug ca. 1 %.

$\bar{X} \pm S.E.M.$ bedeutet der Mittelwert der aufgeführten Durchmesser und die Standardabweichung des Mittelwerts in den unterschiedlichen Personengruppen.

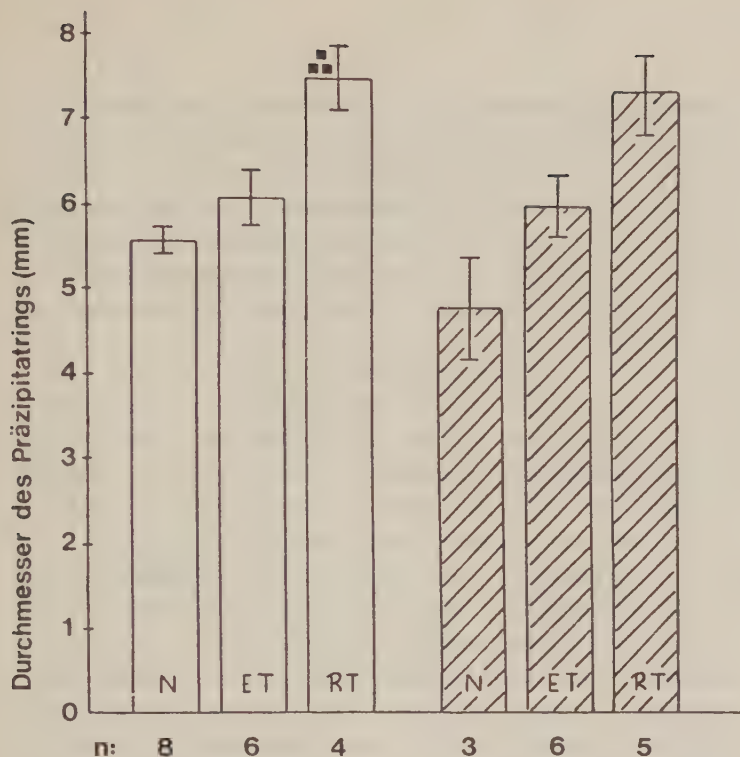


Abb.9 Fibrinogenkonzentration im Plasma

Säulen geben den Durchmesser des Präzipitatrings wieder
 ( ohne Thrombozytenaggregationshemmer, siehe Tab. 21
 mit Thrombozytenaggregationshemmern, siehe Tab. 22)
 Durch vertikale Balken wird die Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt.

N: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

n bezeichnet die Anzahl der statistisch ausgewerteten Meßwerte; die statistische Auswertung erfolgte nach dem ungepaarten t-Test.

■ ■ $p < 0,0005$ (Vergleich zwischen N und RT)

3.2 Plasma-Konzentration des α_1 -sauren Glykoproteins

In der Literatur ist eine hemmende Wirkung des α_1 -sauren Glykoproteins auf die Thrombozytenaggregation beschrieben worden (Snyder & Coodley, 1976). Dies gab den Anlaß, zu prüfen, ob das abnorme Aggregationsverhalten der ET-Patienten auf veränderte Plasmaspiegel dieses Proteins zurückgeführt werden könne.

Tatsächlich lagen die Präzipitatriנגdurchmesser der ET-Patienten mit und ohne thrombozytenaggregationshemmender Therapie durchschnittlich um 33%, bzw. um 32% über denjenigen der entsprechenden Gruppen gesunder Kontrollpersonen (siehe Tab. 23 und 24; Abb. 10); dieser Unterschied war in beiden Fällen statistisch hoch signifikant (jeweils: $p < 0,0005$).

Die Patienten mit reaktiver Thrombozytose unterschieden sich ebenfalls statistisch hoch signifikant ($p < 0,0005$ beim Vergleich sowohl der unbehandelten als auch der behandelten Personengruppen) von gesunden Kontrollpersonen, indem sie ohne Thrombozytenaggregationshemmer 33%, mit Thrombozytenaggregationshemmern sogar 57% über dem jeweiligen Normalkollektiv lagen (siehe Tab. 23 und 24; Abb. 10). Eine klare Abgrenzung zur Gruppe der ET-Patienten war jedoch hinsichtlich der Plasmakonzentration dieses Proteins nicht möglich (siehe Tab. 23 und 24 Abb. 10).

Der durchschnittliche Präzipitatriנגdurchmesser der untersuchten PV-Patienten (unter thrombozytenaggregationshemmender Therapie) lag mit $5,19 \text{ mm} \pm 0,5$ ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$) in der Mitte zwischen dem der gesunden Kontrollpersonen und dem der ET-Patienten (Abstand jeweils 15%).

Ähnlich war die Situation bei der untersuchten Patientin mit CML und hohen Thrombozytenzahlen (ohne thrombozytenaggregationshemmende Therapie), die sich mit einem Präzipitatriנגdurchmesser von $5,3 \text{ mm}$ auch nicht eindeutig einer Gruppe zuordnen ließ.

Die erhöhten Plasmawerte an α_1 -saurem Glykoprotein korrelierten nicht mit abgeschwächtem Aggregationsverhalten. Im Gegenteil reagierte die Gruppe der Patienten mit reaktiver Thrombozytose, die höchste Konzentrationen an α_1 -saurem Glykoprotein aufwies, bei der Adrenalin-, ADP-, Kollagen- und Thrombin-induzierten Aggregation ohne Thrombozytenaggregationshemmer am stärksten.

KP	1	2	4	5	6	7	8	9	12	$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$		
Durchmesser des Präzipitatings / mm /	5,2	4,61	4,32	4,5	4,15	4,38	4,78	4,57	4,73	$4,58 \pm 0,1$		
Plasmakonzentration / g/l /	0,58	0,37	0,28	0,33	0,22	0,29	0,43	0,39	0,41	$0,37 \pm 0,03$		
ET	18	19	20	21	22	$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$						
Durchmesser des Präzipitatings / mm /	6,3	5,81	6,87	5,07	6,31	$6,07 \pm 0,3$	RT	25	26	27	28	$\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$
Plasmakonzentration / g/l /	1,03	0,82	1,3	0,53	1,03	$0,94 \pm 0,1$	Durchmesser des Präzipitatings / mm /	6,06	6,47	5,55	6,23	$6,08 \pm 0,2$
							Plasmakonzentration / g/l /	0,93	1,12	0,71	1,0	$0,94 \pm 0,1$

Tabelle 23: Plasmakonzentration des α_1 -sauren Glykoproteins - ohne Thrombozytenaggregationshemmer

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Alle drei untersuchten Personengruppen nahmen derzeit keine thrombozytenaggregationshemmenden Medikamente ein.

Aufgeführt ist der Mittelwert aus der 6-fachen Ausmessung jedes Präzipitatings; der relative Fehler bei der Bestimmung des Durchmessers betrug ca. 1 %.

$\bar{X} \pm S.E.M.$ bedeutet der Mittelwert der aufgeführten Durchmesser und die Standardabweichung des Mittelwerts in den unterschiedlichen Personengruppen.

KP	31	32	33	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$	RT	44	45	46	47	48	49	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$
Durchmesser des Präzipitatings / mm /	4,65	4,63	4,3	$4,33 \pm 0,1$	Durchmesser des Präzipitatings / mm /	8,88	7,65	7,95	6,08	6,35	5,85	$7,13 \pm 0,5$
Plasmakonzentration / g/l /	0,38	0,37	0,27	$0,34 \pm 0,04$	Plasmakonzentration / g/l /	2,45	1,71	1,88	0,93	1,05	0,84	$1,48 \pm 0,3$
ET	34	35	36	37	38	39	41	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$				
Durchmesser des Präzipitatings / mm /	6,16	6,04	5,73	6,03	6,44	5,44	6,51	$6,05 \pm 0,1$				
Plasmakonzentration / g/l /	0,97	0,92	0,78	0,91	1,05	0,67	1,13	$0,92 \pm 0,4$				

Tabelle 24 Plasmakonzentration des α_1 -sauren Glykoproteins - mit Thrombozytenaggregationshemmern

KP: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

Folgende thrombozytenaggregationshemmenden Substanzen waren eingenommen worden:

Acetylsalicylsäure von: Person Nr. 32, 36, 41, 45

Acetylsalicylsäure + Dipyridamol von: Person Nr. 31, 33, 34, 35, 37, 38, 39

Indometacin von: Person Nr. 44, 46, 47, 48

Prostazyklin i. v. und Acetylsalicylsäure von: Person Nr. 49

Aufgeführt ist der Mittelwert aus der 6-fachen Ausmessung jedes Präzipitatings; der relative Fehler bei der Bestimmung des Durchmessers betrug ca. 1 %.

$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$ bedeutet der Mittelwert der aufgeführten Durchmesser und die Standardabweichung des Mittelwerts in den unterschiedlichen Personengruppen.

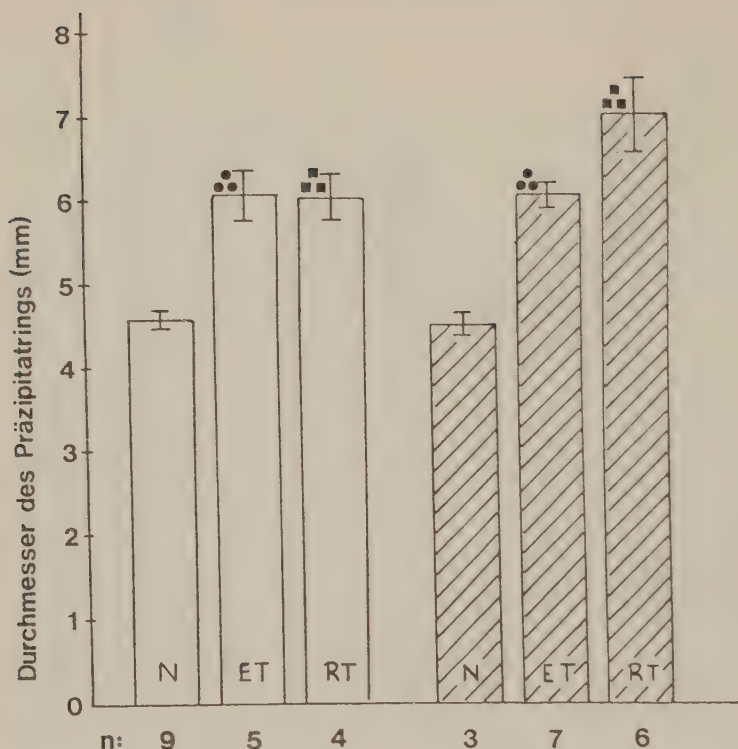


Abb.10 Plasmakonzentration des α_1 -sauren Glykoproteins

Säulen geben den Durchmesser des Präzipitattrings wieder ( ohne Thrombozytenaggregationshemmer, siehe Tab. 23  mit Thrombozytenaggregationshemmern, siehe Tab. 24) Durch vertikale Balken wird die Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt.

N: Gesunde Kontrollpersonen

ET: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

RT: Patienten mit Reaktiver Thrombozytose

n bezeichnet die Anzahl der statistisch ausgewerteten Meßwerte; die statistische Auswertung erfolgte nach dem ungepaarten t-Test.

••• $p < 0,0005$ (Vergleich zwischen N und ET)

■ ■ ■ $p < 0,0005$ (Vergleich zwischen N und RT)

Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die intrazellulären cAMP-Konzentrationen der Thrombozyten, welche die Aggregationsneigung direkt beeinflussen (Hillmar et al., 1984), wurden bisher bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie nicht gemessen. Sie erwiesen sich in den durchgeführten Untersuchungen als vergleichbar mit denen, die bei gesunden Kontrollpersonen gemessen wurden. Die verminderten Aggregationsreaktionen bei ET lassen sich folglich nicht auf erhöhte intrathrombozytäre cAMP-Spiegel zurückführen.

Niedrige basale cAMP-Konzentrationen fielen bei einer Patientin mit CML auf, begleitet von einer ausgeprägten Aggregationsneigung in vitro nach Stimulation mit Adrenalin, ADP, Kollagen und Thrombin.

- Das α -saure Glykoprotein, welches die ADP- und Adrenalin-induzierte Aggregation zu hemmen vermag und bislang noch nicht bei Patienten mit einer myeloproliferativen Erkrankung untersucht worden war, wurde im Plasma von ET-Patienten bestimmt. Im Vergleich zu Normalpersonen wurden bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie signifikant höhere Plasmakonzentrationen festgestellt, die allerdings immer noch unterhalb des aggregationshemmenden Konzentrationsbereichs lagen.

- Die Untersuchungen zur Thrombozytenaggregation wurden mit verschiedenen, teilweise eher selten eingesetzten Aggregationsauslösern durchgeführt. Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde der Einfluß der verordneten Medikamente, insbesondere der Thrombozytenaggregationshemmer beachtet.

Wenn die Aggregation mit ADP, Kollagen oder PAF induziert wurde, zeigte sich bei den ET-Patienten eine signifikant schwächere Aggregationsantwort als bei den Kontrollgruppen. Bei diesen aggregationsauslösenden Substanzen machte sich der Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern im Sinne

einer Abschwächung der Aggregationsreaktion bemerkbar; dieser Effekt war bei den Patienten mit reaktiver Thrombozytose am deutlichsten ausgeprägt. Im Gegensatz hierzu löste das seltener zu Aggregationsuntersuchungen verwendete Thrombin bei Normalpersonen und ET-Patienten ähnliche Aggregationsantworten aus. Wie auch in der Literatur beschrieben (O'Brien & Oxon, 1968) wurde die thrombininduzierte Aggregationsantwort durch Thrombozytenaggregationshemmer nicht abgeschwächt. RT-Patienten reagierten weitaus stärker auf Thrombin als die beiden anderen untersuchten Gruppen.

- Die in der Literatur beschriebene, für die essentielle Thrombozythämie typische Hypoaggregabilität auf Adrenalin zeigte sich auch mit bemerkenswerter Konstanz in den durchgeführten Aggregationsuntersuchungen. Adrenalin löste in einem Konzentrationsbereich von 0.001 µg/ml bis 100µg/ml bei Normalpersonen und RT-Patienten vergleichbare, dosisabhängige Reaktionen aus, während bei ET-Patienten über den gesamten Konzentrationsbereich eine signifikant schwächere Aggregationsantwort zu verzeichnen war. Dieser Unterschied erwies sich als unabhängig vom Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente und erlaubte eine sichere Abgrenzung der ET-Patienten von gesunden Kontroll-Personen und Patienten mit reaktiver Thrombozytose. Diese Untersuchung könnte durchaus zur Diagnosesicherung einer essentiellen Thrombozythämie beitragen.

- Die Fibrinogen-Konzentrationen im Plasma von ET-Patienten bewegten sich im Normbereich.

Die vorliegenden Ergebnisse ermöglichen eine Aussage zu einigen der derzeit diskutierten Hypothesen, die zur Erklärung der Thrombozytendefekte bei myeloproliferativen Erkrankungen aufgestellt wurden: Zahlreiche Publikationen versuchen, die gestörte Thrombozytenfunktion bei der essentiellen Thrombozythämie und bei den anderen myeloproliferativen Erkrankungen, die sich in einer teilweise erheblichen klinischen Symptomatik, aber auch in pathologischen Befunden bei

in-vitro Untersuchungen der Thrombozytenstruktur und -funktion äußert, durch veränderte biochemische Mechanismen zu deuten: die meisten Autoren korrelieren den Defekt mit einer Störung am, bzw. im Plättchen selbst, seien nun die Membranzusammensetzung oder intrazelluläre Metabolisierungsvorgänge betroffen. Seltener wird der Defekt dem Einfluß einer modifizierenden Serumkomponente zugeschrieben.

Am häufigsten beschrieben ist ein abgeschwächtes Aggregationsverhalten in vitro (Fabris et al., 1981; Ginsburg, 1975), was in auffälligem Gegensatz zu den unter diesen Patienten gehäuft auftretenden thrombembolischen Komplikationen steht, die auf ein gesteigertes Aggregationsverhalten in vivo schließen lassen. Bei bekannt hohen Spontanaggregationsraten in vivo (Wu, 1978) wäre dieser Widerspruch mit dem Vorhandensein bereits desaggregierter, d.h. "abreagierter" Thrombozyten in der Testküvette zu erklären (Boughton et al., 1977). Besonders stark vermindert, bzw. fehlend ist die Aggregationsantwort in vitro nach Adrenalinzugabe (Fabris et al., 1981; Ginsburg, 1975; Yamamoto et al., 1984); aufgrund dieses Befundes wird eine Verminderung der α_2 -adrenergen Rezeptoren diskutiert (Kaywin et al., 1978).

Die teilweise deutlich abgeschwächte Aggregationsneigung der Thrombozyten bei essentieller Thrombozythämie ließ sich in den vorliegenden Untersuchungen bestätigen, die mit verschiedenen Aggregationsauslösern in Konzentrationen durchgeführt wurden, die bis zu zwei Zehnerpotenzen unter den sonst in der Literatur angegebenen Werten lagen (Fabris et al., 1981; Yamamoto et al., 1984). Dieses Vorgehen erschien sinnvoll, weil die Dosisabhängigkeit der Adrenalin-induzierten Aggregationsantwort erkennen ließ, daß die Empfindlichkeit der Plättchen bei höheren Konzentrationen abgeschwächt ist. Dies könnte in der Reduzierung α -adrenerger Rezeptoren und/oder einer Minderung deren Affinität gegenüber α -adrenergen Agonisten bei hohen extrazellulären Adrenalinkonzentrationen begründet sein (Handin et al., 1978).

Es wurde ein Konzentrationsoptimum erarbeitet, um die vermin-

derte Aggregationsneigung der Thrombozyten von ET-Patienten, die sich auch durch hohe Adrenalinkonzentrationen nicht normalisieren läßt (Inceman & Tangün, 1972), eindeutig beurteilen zu können. Im Gegensatz zu anderslautenden Literaturbefunden (Bierme et al., 1972; Reid et al., 1982) war mit Adrenalin so eine eindeutige Abgrenzung des ET-Kollektivs zum Normalkollektiv, bzw. der Patientengruppe mit reaktiver Thrombozytose möglich.

Geringer ausgeprägt, jedoch vorhanden waren Unterschiede hinsichtlich Kollagen- und ADP-induzierter Aggregation. Zu einer eindeutigen Diskriminierung zwischen den untersuchten Personengruppen schienen diese Aggregationsauslöser weniger geeignet.

Bei der Verwendung von seltener angewandten Aggregationsauslösern wie Thrombin, oder dem in diesem Zusammenhang noch nicht eingesetzten Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF), konnten Hinweise auf Rezeptorbeschaffenheit und intrazelluläre Signalvermittlung erlangt werden.

Es ergaben sich im Aggregationsverhalten auf Thrombin keine Unterschiede zwischen Normal- und ET-Kollektiv; die PAF-induzierte Aggregation dagegen war bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie gehemmt.

Die Besetzung des Thrombinrezeptors und dessen Wechselwirkung mit bestimmten membranständigen Glykoproteinen (Ganguly et al., 1978) induziert die Phosphatidylinositol-Hydrolyse. Die dabei entstehenden Signalvermittler wie Diacylglycerol und Inositrtriphosphat sind verantwortlich für die Phosphorylierung bestimmter Strukturproteine und damit für die Formveränderung und Sekretionsleistung der Thrombozyten, für Calciumströme und die Entstehung von aggregationsfördernden Metaboliten der Arachidonsäure (Philipps et al., 1980; Holmsen et al., 1981).

Dieselbe Signalkaskade wird bei der PAF-induzierten Aggregation ausgelöst, nachdem ein für PAF spezifischer Rezeptor besetzt worden ist, der mit dem alpha-adrenergen Rezeptor auf eine noch nicht näher untersuchte Weise gekoppelt zu

sein scheint (Chesney et al.,1985).

Die normale Aggregationsantwort auf Thrombin bei Patienten mit ET deutet einmal auf einen intakten Thrombinrezeptor hin, zum anderen auf eine normale, wie oben angeführte, intrazelluläre Signalvermittlung. Die Tatsache jedoch, daß die PAF-induzierte Aggregation bei ET-Thrombozyten gehemmt ist, zeigt, daß in diesem Fall der Rezeptor, der als Voraussetzung zur Signalvermittlung besetzt werden muß, entweder selbst defekt ist, oder daß dessen Zusammenwirken mit den alpha-adrenergen Rezeptoren gestört ist.

Bei den untersuchten Gruppen wurde stets der Einfluß der verordneten Medikamente, insbesondere der Thrombozytenaggregationshemmer beachtet. Einem so therapierten ET-Kollektiv wurde eine vergleichbare Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Der Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern wirkte sich bei den verschiedenen Aggregantien in unterschiedlichem Ausmaß aus; dies läßt sich durch den unterschiedlichen Einfluß erklären, den Thrombozytenaggregationshemmer wie z.B. Acetylsalicylsäure auf die erste und zweite Phase der Aggregation ausüben (O'Brien & Oxon,1968): Die erste Phase, die noch nicht mit Freisetzungsreaktionen nennenswerten Ausmaßes gekoppelt ist und auf die ein großer Teil der standardisierten Meßzeit entfiel, wird bei Adrenalin- und ADP-induzierter Aggregation nicht beeinflusst. Die Thrombin-induzierte Aggregation wird durch diese Substanzen in keiner Phase beeinflusst, während sie bei der Kollagen- und PAF-induzierten Aggregation im stärksten Maße wirken. Bei PAF ist die erste Phase gehemmt, bei Kollagen - einem indirekt über Freisetzung von intrazellulären Arachidonsäuremetaboliten wirkenden Aggregans (Zucker & Nachmias,1985) - durch eine Latenzzeit verändert; die zweite Phase fehlt bei beiden Aggregationsauslösern. Bei den beiden Patientenkollektiven entsprachen die gemessenen Veränderungen der Aggregationsreaktionen beim Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern den in der angeführten Literatur beschriebenen Effekten. Beim Vergleich der beiden Normalkollektive fiel auf, daß mit Adrenalin und ADP

die durchschnittlichen Flächen unter der Aggregationskurve im Normalkollektiv unter Thrombozytenaggregationshemmern größer waren als ohne diese Medikamente; diese Differenz zwischen den beiden Normalkollektiven in ihren Durchschnittswerten kann mit der inter- und intraindividuellen Variabilität der Aggregationsantwort auf Adrenalin erklärt werden (O'Brien, 1964).

Trotz dieser Schwankungen bei den gesunden Kontrollpersonen war mittels Untersuchung der adrenalininduzierten Thrombozytenaggregation - unabhängig vom Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente - eine klare Abgrenzung der Patienten mit essentieller Thrombozythämie möglich. Die Messung der Adrenalin-induzierten Aggregationsantwort bei verschiedenen Adrenalinkonzentrationen ermöglichte nicht nur eine recht zuverlässige Abgrenzung der essentiellen Thrombozythämie gegenüber einem Normalkollektiv, sondern auch - für die klinische Praxis wohl relevanter - gegenüber reaktiven Thrombozytosen. Nach den vorliegenden Untersuchungen kann sie in diagnostisch unklaren Fällen durchaus eine Hilfe zur Entscheidungsfindung darstellen.

Die Vorstellung von defekten und/oder reduzierten α_2 -adrenergen Rezeptoren der Thrombozytenmembran vermag allein noch nicht alle beobachteten Störungen der Thrombozytenfunktion bei der essentiellen Thrombozythämie zu erklären, und es existieren noch vielfältige andere Hypothesen:

Ausgehend von dem in-vitro Befund, durch Anreicherung der Thrombozytenmembran mit Cholesterin, also durch eine Abänderung des Cholesterin/Phospholipidverhältnisses eine erhöhte Aggregationsantwort auf Adrenalin und ADP erreichen zu können (Shattil et al., 1975; Insel et al., 1978), wird in manchen Arbeiten die Möglichkeit einer veränderten Lipidzusammensetzung bei der essentiellen Thrombozythämie erörtert. Es gibt ferner Hinweise, daß bei der essentiellen Thrombozythämie die Verhältnisse einzelner Phospholipidklassen zueinander verändert sind (Breuer et al., 1981); auch ein verändertes Phospholipidmuster der Thrombozytenmembran kann in Zu-

sammenhang mit einem abnormen Aggregationsverhalten der Thrombozyten gebracht werden (Breuer et al.,1981; Perret et al.,1983).

Andere Autoren begründen die verminderte Aggregationsneigung mit der gestörten Bereitstellung von intrazellulären Metaboliten, die im Laufe der Aggregation aus granulären Speichern freigesetzt werden - wie z.B. ADP und Serotonin - und die zweite Phase des Aggregationsverlaufs mitbestimmen (Pareti et al.,1984; Yamamoto et al.,1984). Weitere Nucleotidgehalte - auch die des cAMP, dessen intrazelluläre Konzentration die Aggregation direkt beeinflusst (Hillmar et al.,1984; Steen & Holmsen,1984) - wurden in diesem Zusammenhang noch nicht bestimmt. Die Messung der basalen intrathrombozytären cAMP-Spiegel im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab keine erhöhten Werte bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie. Es zeigte sich, daß bei gleichzeitiger Hemmung der Phosphodiesterase (E.C.3.1.4.1.) die basalen cAMP-Spiegel bei den ET-Patienten mit Thrombozytenaggregationshemmern signifikant niedriger waren als bei denjenigen ohne thrombozytenaggregationshemmende Therapie. Bisher ist nicht publiziert worden, welchen Einfluß Cyclooxygenasehemmer auf die Aktivität der Adenylatzyklase (E.C.4.6.1.1.), bzw. die cAMP-Spiegel ausüben und eine Deutung dieses Sachverhaltes steht noch aus. Die wesentliche Frage jedoch, nämlich, ob die verminderte Aggregationsfähigkeit bei der essentiellen Thrombozythämie durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel verursacht wird, konnte durch den Vergleich der cAMP-Gehalte von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit essentieller Thrombozythämie eindeutig beantwortet werden: die cAMP-Spiegel waren vergleichbar und somit nicht für die verminderte Aggregationsneigung in vitro verantwortlich.

Die verminderte Aggregabilität könnte jedoch auch durch eine aggregationshemmende Substanz im Plasma verursacht werden, wie es z.B. für das Bartter-Syndrom beschrieben wurde (O'Regan et al.,1979). Einige Literaturbefunde deuten allerdings darauf hin, daß sich Plättcheneigenschaften nicht durch das

umgebende Plasma modifizieren lassen. So bleiben adrenalin-resistente Plättchen auch nach Zusatz von adrenalinsensitivem Plasma resistent (O'Brien, 1964) und Normal-Thrombozyten lassen sich in ihrer Funktion nicht durch Plasma von ET-Patienten beeinflussen (Kaywin et al., 1978).

Die vorliegenden Versuche mit einer noch kleinen Zahl an Kreuzproben zeigen zum überwiegenden Teil, daß sich eine verminderte Aggregierbarkeit durch Zusatz von Normalplasma nicht zur Normalfunktion "aufbauen" läßt.

Parallel dazu wurde geprüft, ob die Konzentration eines Akut-Phase-Proteins, des α_2 -sauren Glykoproteins, welches die Adrenalin- und ADP-induzierte Aggregation zu hemmen vermag (Snyder & Coodley, 1976), bei den ET-Patienten erhöht ist. Dies traf zwar zu, aber die Werte lagen noch deutlich unter den Konzentrationen, die von den oben erwähnten Autoren als hemmend beschrieben wurden ($>1,25$ mg/ml); außerdem wurde beobachtet, daß die Konzentrationen bei Patienten mit reaktiver Trombozytose, die eine verstärkte Aggregationsneigung aufwiesen, noch höher - teilweise bereits im aggregationshemmenden Bereich oberhalb $1,25$ mg/ml - lagen. Somit erscheint die Existenz eines hemmenden Serumfaktors bei der essentiellen Thrombozythämie unwahrscheinlich.

Die These, daß das Plasma von ET-Patienten keine pathologischen Veränderungen aufweist und die ET-bedingte Symptomatik auf Defekte an den Plättchen selbst zurückzuführen ist, wurde weiterhin durch die Ergebnisse der Fibrinogenbestimmung im Plasma von ET-Patienten gestützt: Fibrinogen ist als Kofaktor für die Aggregation notwendig und in gewaschenen Thrombozytensuspensionen kann ohne Fibrinogen weder eine Adrenalin-, noch eine ADP-induzierte Aggregation ausgelöst werden (Tangen et al., 1973).

Da beim ET-Kollektiv mit Aggregationsauslösern, die in Beziehung zu Fibrinogenrezeptoren der Thrombozytenmembran stehen - Adrenalin, ADP und Kollagen bewirken nämlich bei der Bindung an ihre jeweiligen Rezeptoren eine Freilegung, bzw. Aktivierung von Fibrinogenrezeptoren (Di Minno et al.,

1983; Legrand et al., 1985) - ein abgeschwächtes Aggregationsverhalten zu beobachten ist, ergab sich die in der Literatur noch nicht geprüfte Frage, ob Fibrinogenbindung oder -Konzentration im Plasma erniedrigt sind.

Die vorliegenden Ergebnisse haben erbracht, daß die Plasma-Fibrinogenkonzentration bei essentieller Thrombozythämie im Normalbereich liegt und folglich nicht für die reduzierte Aggregationsantwort auf Adrenalin, ADP und Kollagen verantwortlich sein kann. Die Bindung von Fibrinogen an die entsprechenden Rezeptoren der Thrombozytenmembran wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, so daß zu diesem Punkt keine Aussage gemacht werden kann.

Die Tatsache, daß bei essentieller Thrombozythämie nicht nur ein abgeschwächtes Aggregationsverhalten in vitro und hämorrhagische Komplikationen in vivo festgestellt werden, sondern auch gehäuft thrombembolische Komplikationen auftreten, führt zu weiteren Interpretationsschwierigkeiten. Eine Erklärung für diese paradoxen klinischen Symptome bietet die Hypothese des bei der ET gestörten Arachidonsäure Stoffwechsels an: danach soll bei selektivem Lipoxxygenase-Mangel (E.C.1.13.1.13) relativ mehr Arachidonsäure für die Thromboxan A_2 -Bildung zur Verfügung stehen - einem Hauptmediator der Thrombozytenaggregation - und so die Thromboseneigung bewirken (Schafer, 1982). Die in anderen Fällen zu beobachtende Blutungstendenz soll aus einem gleichzeitigen Defekt der Cyclooxygenase (E.C.5.3.99.3.) resultieren (Okuma & Uchino, 1979).

Einige Arbeitsgruppen haben vergeblich versucht, die bei der essentiellen Thrombozythämie beobachteten sowohl thrombembolischen, als auch hämorrhagischen Komplikationen mit verschiedenen Laborparametern wie Thrombozytenzahl, Blutungszeit, Adhäsionsneigung zu korrelieren (Adams et al., 1974; Cortellazzo et al., 1981; Pareti et al., 1982).

Aus der Notwendigkeit, daß zur experimentellen Prüfung der Hypothesen eigentlich viele biochemische Arbeitsmethoden

gleichzeitig am gleichen Patientenkollektiv eingesetzt werden müßten, resultieren wohl die in der Literatur häufig zu findenden Versuche, das abnorme Thrombozytenverhalten jeweils anhand nur eines Defekts zu erklären.

Widersprüchliche Befunde ergeben sich möglicherweise auch aus der Schwierigkeit einer eindeutigen Zuordnung zur Gruppe der essentiellen Thrombozythämie, entweder weil die Abgrenzung zur reaktiven Thrombozytose durch begleitende Erkrankungen nicht möglich ist, oder weil die sichere Unterscheidung von einer anderen myeloproliferativen Erkrankung nicht erreicht werden kann.

Zur Sicherung der Diagnose einer essentiellen Thrombozythämie hat sich, insbesondere bei nur gering erhöhten Thrombozytenzahlen, die Knochenmarkshistologie als nützlich erwiesen. Differentialdiagnostisch ist sie vor allem zur Abgrenzung gegenüber reaktiven Thrombozytosen hilfreich; eine histologische Abgrenzung gegenüber anderen myeloproliferativen Erkrankungen kann in Einzelfällen schwierig sein (Jahn, 1987). Da auch bei reaktiven Thrombozytosen eine gesteigerte Megakaryopoese im Knochenmark vorliegt, erlaubt dieser Befund allein noch keine eindeutige Abgrenzung der essentiellen Thrombozythämie; finden sich neben einer gesteigerten Megakaryopoese auch noch in Gruppen angeordnete Megakaryozyten und Riesenmegakaryozyten, wird die Diagnose einer essentiellen Thrombozythämie wahrscheinlicher (Hussain et al., 1978). Auch die Beurteilung des durchschnittlichen Volumens der Megakaryozyten kann weiterhelfen: Bei essentieller Thrombozythämie und Polycythaemia Vera ist das Durchschnittsvolumen der einzelnen Megakaryozyten um den Faktor 1.5 - 2 größer als normalerweise (Branehög et al., 1975). Im Gegensatz hierzu finden sich bei reaktiven Thrombozytosen und bei der chronisch myeloischen Leukämie Megakaryozyten, deren Volumen bis auf 2/3 der Norm reduziert ist (Harker & Finch, 1969).

Als weiteres Unterscheidungskriterium bieten sich Untersu-

chungen der Thrombozytenfunktion an; hier scheinen nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit Aggregationstests mit Adrenalin als aggregationsauslösender Substanz eine recht zuverlässige Aussagekraft zu besitzen.

Allerdings sollte bei Aggregationsuntersuchungen beachtet werden, daß ganz unterschiedliche Faktoren - wie Untersuchungsbedingungen, Medikamente, Nikotin - Einfluß auf das Aggregationsverhalten haben.

Thrombozytenaggregationshemmer vom Typ der Acetylsalicylsäure verändern die erste Phase der adrenalininduzierten Aggregation nicht, so daß unabhängig vom Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente eine Aussage möglich ist, wenn die Meßzeit auf die erste Phase der Aggregation beschränkt wird.

Des weiteren ist auf Begleiterkrankungen zu achten, die das Aggregationsverhalten der Thrombozyten modifizieren können. So wurde z.B. über eine gesteigerte Aggregationsneigung der Thrombozyten bei Diabetes mellitus (Di Minno et al., 1985; Greco et al., 1985) oder Psoriasis (Berrettini et al., 1985) berichtet.

In der Literatur sind Versuche beschrieben, die ET von Thrombozythämien im Rahmen anderer myeloproliferativer Erkrankungen wie CML oder PV anhand der Plättchenfunktion abzugrenzen (Ginsburg, 1975; Boneu et al., 1980).

Dies wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht. Dazu wurden ergänzende Untersuchungen an vier Patienten mit erhöhter Thrombozytenzahl bei anderen myeloproliferativen Erkrankungen durchgeführt und mit den Ergebnissen bei essentieller Thrombozythämie verglichen.

Bei der CML-Patientin fielen niedrige basale cAMP-Konzentrationen und starke Aggregationsantworten nach Adrenalin, ADP, Kollagen und Thrombin auf. Eine Abgrenzung zur ET scheint hinsichtlich des Aggregationsverhaltens möglich zu sein (Adams et al., 1974), was jedoch mit Hilfe eines CML-Kollektivs überprüft werden müßte.

Bei den drei PV-Patienten hingegen ließ sich kein Unterschei-

dungskriterium gegenüber ET-Thrombozyten erarbeiten. Dies unterstreicht die enge Verwandtschaft zwischen beiden Krankheitsbildern, die häufig diagnostische Schwierigkeiten bereiten kann (Murphy,1983).

Abschließend läßt sich sagen, daß die in der Literatur beschriebene Hypoaggregabilität von ET-Thrombozyten bei adrenalininduzierten in-vitro Aggregationen (Hussain et al.,1978; Schafer,1984) in der vorliegenden Arbeit an einer größeren Anzahl eigener ET-Patienten (n=16) bestätigt wurde und sich als Diagnosekriterium zur Abgrenzung gegenüber reaktiven Thrombozytosen einsetzen ließ. Dieses empirisch gewonnene Wissen, daß bei essentieller Thrombozythämie im Rahmen einer allgemeinen Hypoaggregabilität die adrenalin-induzierte Aggregationsantwort besonders stark abgeschwächt ist, scheint für diagnostische Zwecke in der klinischen Praxis durchaus ausreichend und hilfreich zu sein; doch für ein tieferes Verständnis der Thrombozytendefekte bei der essentiellen Thrombozythämie sollte geklärt werden, warum selektiv die Adrenalinantwort in vitro derartig ausgeprägt vermindert ist.

In diesem Zusammenhang erscheint - auch aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit - eine genauere Untersuchung der α_2 -adrenergen Rezeptoren der Thrombozytenmembran sinnvoll. Dies könnte z.B. durch Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Agonisten geschehen, um Aufschluß darüber zu erhalten, ob die Anzahl der Rezeptoren insgesamt, bzw. deren Verfügbarkeit vermindert, oder die Affinität der Rezeptoren zum Agonisten abgeschwächt ist. Auch Störungen in Mechanismen, die mit den α_2 -adrenergen Rezeptoren in Verbindung stehen, sind vorstellbar; die deutlich abgeschwächte Aggregationsantwort auf PAF kann ein Hinweis hierauf sein.

Vielleicht könnte hierdurch ein Beitrag zum Verständnis der bunten, teilweise paradoxen Symptomatik bei essentieller Thrombozythämie geleistet werden.

Zusammenfassung

Die essentielle Thrombozythämie (ET) ist eine chronisch myeloproliferative Erkrankung; sie kann bei den betroffenen Patienten zu schwerwiegenden thrombembolischen und/oder hämorrhagischen Komplikationen führen. Diese ET-bedingten Symptome sind nach dem derzeitigen Erkenntnisstand wahrscheinlich weniger auf die Thrombozytenzahl als vielmehr auf pathologische Thrombozytenfunktionen zurückzuführen und können daher auch schon bei Thrombozytenzahlen auftreten, die unterhalb der für die Diagnose ET geforderten Grenze von 1 Mio Thrombozyten/ μ l und damit in einem Bereich liegen, der auch durch reaktive Thrombozytosen (RT) erreicht wird, wie sie bei entzündlichen und malignen Grunderkrankungen, nach Splenektomien und bei ulcerierenden/nekrotisierenden Durchblutungsstörungen anderer Genese gefunden werden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein zusätzliches Kriterium untersucht werden, das unabhängig von der Thrombozytenzahl zur Sicherung der Diagnose einer ET beitragen kann.

Am Blut von 16 Patienten mit essentieller Thrombozythämie (ET) und 9 Kontrollpersonen mit reaktiver Thrombozytose (RT), sowie 13 gesunden Personen wurden Aggregationsuntersuchungen durchgeführt, da das Aggregationsverhalten eine verhältnismäßig gute Aussagekraft bezüglich der Thrombozytenfunktion zu besitzen schien.

Für die Messungen wurde plättchenreiches Plasma mit Na-Citrat als Antikoagulans verwendet. Wenn die Aggregation mit ADP (0.01μ M), Kollagen (0.1μ g/ml) oder PAF (0.5μ M) induziert wurde, zeigte sich bei den ET-Patienten eine signifikant schwächere Aggregationsantwort (35%-44% des Wertes der beiden Kontrollgruppen). Auf den Einfluß von Thrombozytenaggregationshemmern reagierten RT-Patienten stärker als ET-Patienten und Normalpersonen. Thrombin (0.05 U/ml) bewirkte - unabhängig von aggregationshemmenden Substanzen - bei Normalpersonen und ET-Patienten ähnliche Aggregationen; RT-Patienten

reagierten dagegen weitaus stärker. Am besten differenzierte die Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation zwischen ET-Patienten und Kontrollen. Adrenalin löste in einem Konzentrationsbereich von 0.001µg/ml bis 100µg/ml bei Normalpersonen und RT-Patienten vergleichbare dosisabhängige Reaktionen aus. Bei ET-Patienten hingegen war über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich eine signifikant schwächere Aggregationsantwort zu verzeichnen (28%-34% der Kontrollen). Dieser Unterschied erwies sich als unabhängig vom Einfluß thrombozytenaggregationshemmender Medikamente.

Die Prüfung der adrenalininduzierten Thrombozytenaggregation über einen größeren Konzentrationsbereich scheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit als zusätzliches diagnostisches Kriterium der ET, vor allem zur Abgrenzung gegenüber der RT durchaus geeignet zu sein.

Es wurden zusätzlich verschiedene Faktoren untersucht, die das Aggregationsverhalten beeinflussen können:

Die Plasmakonzentration des α_1 -sauren Glykoproteins erreichten zwar nie den Konzentrationsbereich, in dem diese Substanz aggregationshemmend wirkt, dennoch wurde bei ET-Patienten eine im Vergleich zu Normalpersonen signifikant höhere Plasmakonzentration festgestellt.

Die Fibrinogenkonzentration im Plasma von ET-Patienten bewegte sich im Normbereich.

Die bisher nicht untersuchten intrathrombozytären cAMP-Spiegel bei ET erwiesen sich als vergleichbar mit normalen Werten und können daher auch nicht für die verringerte Aggregationsneigung der Plättchen bei ET-Patienten verantwortlich gemacht werden.

Literaturverzeichnis

ADAMS, T.; SCHULTZ, L.; GOLDBERG, L. (1974): Platelet Function Abnormalities in the Myeloproliferative Disorders - Scand. J. Haematol. 13: 215-224.

ALMER, L.; KJELLSTROEM, T. (1984): Effects of Bezafibrate on Lipids, Coagulation and the Fibrinolytic System - Abstractband S.287 - Abstr. P18-6; 17th Inter. Congr. of Intern. Med., Kyoto 1984.

AMBRUS, J.L.; AMBRUS, C.M.; TAHERI, S.A.; GASTPAR, H.; REDDINGTON, M. M.; TAHERI, P.; KAHN, E.A.; SCHATTMAN, G.L.; DEAN, L.S.; MOORE, R.H. (1984): Red cell flexibility and platelet aggregation in patients with chronic obstructive vascular disease and study of therapeutic approaches - Angiology 35(7): 418-426.

ANDRASSY, K.; KODERISCH, J.; RITZ, E.; BIANCHI, D. (1983): Influence of Third Generation Cephalosporin and Lamoxactam on Hemostasis - Proceedings III Mediterranean Congr. of Chemotherapy 21-24 Sept. 1982, Dubrovnik, Yugoslavia - Suppl. to no. 5(2), Oct. 1983: 440-441.

ARDLIE, N.G.; PACKHAM, M.A.; MUSTARD, J.F. (1970): Adenosine Diphosphate-Induced Platelet Aggregation in Suspensions of Washed Rabbit Platelets - Br. J. Haematol. 10: 7-17.

ARKELE, Y.S.; SCHROGIE, J.J.; WILLIAMS, R. (1976): Effect of Clonidine and Aspirin on Platelet Aggregation in Human Volunteers - J. Clin. Pharmacol. 16(1): 30-33.

BARBUI, T.; BASSAN, R.; VIERO, P.; CORTELAZZO, S.; DINI, E. (1983): Platelet Function after Busulphan in Chronic Myeloproliferative Disorders - Haematologica 68(4): 469-477.

BECKER, W.; RAPP, W.; SCHWICK, H.G.; STÖRIKO, K. (1968): Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen durch Immunpräzipitation - Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6: 113-122.

BELLUCCI, S.; JANVIER, M.; TOBELEM, G.; FLANDRIN, G.; CHARPAK, Y.; BERGER, R.; BOIRON, M. (1986): Essential Thrombocythemias: Clinical Evolutionary and Biological Data - Cancer 58: 2440-2447.

BENGMARK, S.; GOERRANSSON, G.; ZOUCAS, E. (1981): Defects in hemostasis produced by antibiotics. An in vivo study in the rat - Eur. Surg. Res. 13(4): 290-298.

BERRETTINI, M.; PARISE, P.; CONSTANTINI, V.; GRASSELLI, S.; NENCI, G. (1985): Platelet Activation in Psoriasis - Thromb. Haemostas. 53(2): 195-197.

BIERME, R.; BONEU, B.; GUIRARD, B.; PRIS, J. (1972): Aspirin and Recurrent Painful Toes and Fingers in Thrombocythaemia - Lancet (1): 432.

BÖSE, W.; LINZENMEIER, G.; KARAMA, A.; OLBING, H. (1974): Controlled Trial of Co-Trimoxazole in Children with Urinary-Tract Infection - Lancet (2): 614-616.

BONEU, B.; NOUVEL, C.; SIC, P.; CARANOBE, C.; COMBES, D.; LAURENT G.; PRIS, J.; BIERME, J. (1980): Platelets in Myeloproliferative Disorders - Scand. J. Haematol. 25: 214-220.

BORN, G.V.R.; CROSS, M.J. (1963): The Aggregation of Blood Platelets - J. Physiol. 168: 178-195.

BLUHM, G.B.; RIDDLE, J.M. (1973): Platelets and Vascular Disease in Gout - Semin. Arthritis Rheum. 3/4: 355-366.

BOUGHTON,B.J.; CORBETT,W.E.N.; GINSBURG,A.D.(1977): Myeloproliferative Disorders: a paradox of in-vivo and in-vitro platelet function - J. clin. Path. 30: 228-234.

BRANEHÖG,I.; RIDELL,B.; SWOLIN,B.; WEINFELD,A.(1975): Megakaryocyte quantifications in relation to thrombokinetiks in primary thrombocythaemia and allied diseases - Scandinavian Journal of Haematology 15: 321-332.

BREDDIN,K.; KRZYWANIEK,H.J.; ZIEMEN,M.(1975): Die Rolle der Thrombozyten bei der Thrombogenese in Arterien und Venen. Beziehung zwischen Form- und Funktionswandel der Thrombozyten nach der Blutentnahme - Colfarit-Symposium III,Köln 23. Oktober 1975; S.6-27.

BREUER,J.H.; HARSANYI,V.; SOLTI,V.; HOLLAN,S.R.(1981): Platelet Phospholipids in Thrombocytosis due to Myeloproliferative Disorders - Haemostasis 10: 134-140.

BRUNNER,D.; WIESBROT,J.; SUSSER,A.; KLINGER,J.; VIRAG,J.; SCHWARTZ,S.(1985): The Effect of Bezafibrate on Lipoproteins and Platelet Aggregation - In: Cardiovascular Pharmacotherapy International Symposium 1985,Abstr. No. 267.

CAZENAVE,J.P.; BENVENISTE,J.; MUSTARD,J.F.(1979): Aggregation of rabbit platelets by platelet activating factor is independent of the release reaction and the arachidonate pathway and inhibited by membrane-active drugs - Laboratory Investigation 41: 275-285.

CHESNEY,C.M.; PIFER,C.D.; MUCH,K.M.(1985): Desensitization of Human Platelets By Platelet Activating Factor - Biochem. Biophys. Res. Comm. 127(1): 24-30.

CHIGNARD,M.; LE GAUDIET,J.P.; TENCE,M.(1979): The role of platelet activating factor in platelet aggregation -Nature 279: 799-800.

CLAAS,F.H.J.; VAN DER MEER,J.W.H.; LANGERAK,J.(1979): Immunological effect of co-trimoxazole on platelets - Br. Med. J. 2: 898-899.

COLLER,B.S.(1980): Interaction of normal, thrombasthenic and Bernard-Soulier platelets with immobilized fibrinogen: Defective platelet fibrinogen interaction in thrombasthenics. - Blood 55: 169-178.

CORTELLAZZO,S.; COLUCCI,M.; BARBUI,T.n; DINI,E.; SEMERARO,N.(1981): Reduced Platelet Factor X-Activating Activity - A Possible Contribution to Bleeding Complications in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythaemia - Haemostasis 10: 37-50.

COX,C.P.; LINDEN,J.; SAID,S.J.(1984): VIP elevates Platelet Cyclic AMP Levels and Inhibits In-Vitro Platelet Activation induced by Platelet-Activating Factor - Peptides 5: 325-328.

DE CATERINA,R.; GIANNESSI,D.; CREA,F.; CHIERCHIA,S.; BERNINI,W.; GAZZETTI,P.; L'ABBATE,A.(1983): Antiplatelet Effects of Isosorbide Dinitrate in Man - Z. Kardiol. 72, Suppl. 3: 46-51.

DICKSON,H.G.(1978): Trimethoprim-Sulphamethoxazole and Thrombocytopenia - Med. J. Austr. 2: 5-7.

DI MINNO,G.; CAPITANIO,A.M.; THIAGARAJAN,P.; MARTINEZ,J.; MURPHY,S.(1983): Exposure of Fibrinogen Receptors on Fresh and Stored Platelets by ADP and Epinephrine as Single Agents and as a Pair - Blood 61(6): 1054-1059.

DI MINNO,G.; SILVER,M.J.; CARBONE,A.; RICCARDI,G.; RIVELLESE,A.; MANCINI,M.; THIAGARAJAN,P.(1985): Increased Binding of Fibrinogen to Platelets in Diabetes: The Role of Prostaglandins and Thromboxane - Blood 65(1): 156-162.

EPSTEIN,E.; GOEDEL,A.(1934): Hämorrhagische Thrombozythämie bei vaskulärer Schrumpfmilz - Virchows Arch. Path. Anat. 292: 233-248.

EVENSEN,S.A.; JEREMIC,M.; HJORT,P.F.(1968): Experimental Thrombocytopenia Induced by Busulphan in Rabbits: Extremely Low Platelet Levels and Intact Clotting System - Thromb. Diath. 19(3/4): 570-577.

FABRIS,F.; RANDI,M.C.; SBROJAVACCA,R.; CASONATO,A.; GIROLAMI A.(1981): The Possible Value of Platelet Aggregation Studies in Patients with Increased Platelet Number - Blut 43: 279-285

FIALKOW,P.J.; FAGUET,G.B.; JACOBSON,R.J.(1981): Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell - Blood 58(5): 916-919.

FITZPATRICK,F.A.; GORMAN,R.R.(1979): Regulatory Role of cAMP on the Platelet Cyclooxygenase and Platelet Function - Biochim. Biophys. Acta 582: 44-58.

GANGULY,P.; SUTHERLAND,S.B.; BRADFORD,H.R.(1978): Defective Binding of Thrombin to Platelets im Myeloid Leukemia - Br. J. Haematol. 39(4): 599-605.

GERHARTZ,H.(1964): Anabolika und blutbildendes System in: Bonacker,E. (Hrsg.): Wirkung und Anwendung anaboler Steroide - Berlin,1964; S. 354-358.

GINCHERMAN, E.Z.; TITOVA, S.I.; MAZOVETSKII, A.; PERELYGINA, A.;
GORDEEVA, N.P. (1982): Use of preparations with antiaggregation
and hemostatic action in treating diabetich retinopathy
- Probl. Endokrinol. (Mosk) 28(6): 17-22.

GINSBURG, A.D. (1975): Platelet Function in Patients with High
Platelet Counts - Ann. Intern. Med. 82: 506-511.

GRECO, N.J.; ARNOLD, J.H.; O'DORISIO, T.M.; CATALAND, S.; PANGA-
NOMALA, R.V. (1985): Action of Platelet Activating Factor on
Type 1 Diabetes Human Platelets - J. Lab. Clin. Med. 105:
410-416.

GUPTA, M.C.; DHAMIJA, J.P.; MATHUR, D.S.; SHARMA, B.M. (1983):
Role of Propranolol and Aspirin in Decreasing Platelet Agge-
gation in Occlusive Cerebrovascular Diseases - JAPI 31(9):
565-567.

HAMBERG, M.; SVENSON, J.; SAMUELSSON, B. (1975): Thromboxanes, a
new group of biologically active compounds derived from
prostaglandin endoperoxides - Proceedings of the National
Academy of Sciences USA 72: 2994-2998.

HANDIN, R.J.; COOPER, B.; YOUNG, L.; ALEXANDER, R.W. (1978): Re-
gulation of the human platelet alpha-adrenergic receptor -
Clin. Res. 26: 348A.

HARKER, L.A.; FINCH, C.A. (1969): Thrombokinetiks in man -
Journal of Clinical Investigation 48: 963-974.

HARTWICH, G.; SCHIRMBECK, H.; MÖRL, M. (1975): Thrombozythämie -
gibt es eine primäre Form? - Med. Klin. 70(49): 2005-2008.

HASLAM,R.J.(1975): Roles of cyclic nucleotides in platelet function - In: Biochemistry and Pharmacology of Platelets, Ciba Foundation Symposium 33,pp.121-151. New York,Elsevier/Excerpta medica.

HEHLMANN,R.; JAHN,M.; BAUMANN,B.; HILLMAR,I.; KÖPCKE,W.(1987): Untersuchungen zur Diagnose und Differentialdiagnose der essentiellen Thrombozythämie - Klin. Wochenschr. 65 (Suppl.IX): 185-186.

HEHLMANN,R.; JAHN,M.; BAUMANN,B.; HILLMAR,I.; KÖPCKE,W.(1988): Essential Thrombocythemia: Clinical Characteristics and Course of 57 Cases - zur Veröffentlichung eingereicht.

HEIDRICH,H.(1979) in: Hild,K.(Hrsg.): Therapiekontrolle in der Angiologie - Witzstrock,Baden-Baden,1979: S.402.

HILLER,E.(1980): Medikamentös bedingte Störungen des Gerinnungssystems - Münch. med. Wschr. 122: 1184-1190.

HILLMAR,I.; MURAMATSU,T.; ZÖLLNER,N.(1984): Effects of a Thio Analog of Platelet-Activating Factor on Platelet Aggregation and Adenosine 3',5'-Monophosphate Concentration in Hepatocyte Suspensions and in Platelets - Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365: 33-41.

HOAGLAND,H.C.; SILVERSTEIN,M.N.(1978): Primary thrombocytopenia in the young patient - Mayo Clinic Proceedings 53: 578-580.

HOLMSEN,H.; DANGELMAIER,C.A.; HOLMSEN,K.H.(1981): Thrombin-induced Platelet Responses Differ in Requirement for Receptor Occupancy - J. Biol. Chem. 256: 9393-9396.

HORTON,M.A.; AMOS,R.J.; JONES,R.J.(1983): The effect of H₂ Receptor Antagonists on Platelet Aggregation in Man - Scand. J. Hematol. 31: 15-19.

HUSSAIN,S.; SCHWARTZ,J.M.; FRIEDMAN,S.A.; CHUA,S.N.(1978): Arterial thrombosis in essential thrombocythemia - American Heart Journal 96(1): 31-36.

INCEMAN,S.; TANGÜN,Y.(1972): Platelet defect in the myeloproliferative disorders - Ann NY Acad Sci 201: 251-261.

INSEL,P.A.; NIRENBERG,P.; TURNBULL,J.; SHATTIL,S.J.(1978): Relationships between Membrane Cholesterol,Alpha-adrenergic Receptors and Platelet Function - Biochem. 17(24): 5269-5273.

JABAILY,J.; ILAND,H.J.; LASZLO,J.; MASSEY,E.W.; FAGUET,G.B.; BRIERE,J. ; LANDAW,S.A.; PISCIOTTA,A.V.(1983): Neurologic Manifestations of Essential Thrombocythemia - Annals of Internal Medicine 99: 513-518.

JAHN,M.:Untersuchungen zur klinischen Charakterisierung und Abgrenzung der essentiellen Thrombozythämie - Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, Manuskript in Vorbereitung

JANKA,H.U.; RINNINGER,F.; MEHNERT,H.(1982): Thrombozytenfunktion unter parenteraler Naftidrofuryl-Therapie - Ther. d. Gegenw. 121: 422-433.

KAGAN,G.; ROSE,R.(1976): Double-blind trial of a long-acting bronchodilator preparation ("Netharpin Dospan") in bronchospastic disease - Curr. Med. Res. Opin. 4: 436-441.

KAPLAN,K.L.; BROEKMAN,M.J.; CHERNOFF,A.(1979): Platelet alpha-granules: studies on release und subcellular localization - Blood 53: 604-618.

KAYWIN,P.; MC DONOUGH,M.; INSEL,P.A.; SANFORD,J.S. (1978): Platelet Function in Essential Thrombocythemia - N. Engl J. Med. 299: 505-509.

KINLOUGH-RATHBONE,R.L.; PACKHAM,M.A.; REIMERS,H.J.(1977): Mechanisms of platelet shape change,aggregation and release induced by collagen,thrombin or A23.187 - Journal of Laboratory and Clinical Medicine 90: 707-719.

KIRCH,W.; OHNHAUS,E.E.(1984): Doppelblindvergleich von Ketanserlin und Atenolol im Hinblick auf antihypertensive Aktivität und Einfluß auf die Plättchenfunktion - Therapiewoche 34(45): 6399.

KUTTI,J.(1972): Platelet Production Rate in Polycythemia Vera after Myelosuppressive Therapy - Act. med. scand. 192: 161-164.

LABHART,A.(1978): Die Wirkung der Nebennierenrinden-Hormone in: Labhart,A. (Hrsg.): Klinik der Inneren Sekretion,3. neubearb. Aufl. - Berlin 1978: 309.

LEE,B.Y.; BERKOWITZ,P.; SAVITSKY,J.P.; MAY,G.S.; BROBST,J.; MC CANN,W.J.(1985): Pentoxifylline treatment of moderate to severe occlusive arterial disease - Clin. Cardiol. 8(3): 161-165.

LEGRAND,C.; DUBERNARD,V.; NURDEN,A.T.(1985): Characteristics of collagen-induced fibrinogen binding to human platelets - Biochim. Biophys. Acta 812: 802-810.

LENCI, R.; GALANITE, A.; BORZI, M.; ARIGANELLO, M.; SOMMARIVA, L. (1984): Behavior of Platelet Aggregation During Treatment With Nifedipine - Clin. Ter. 107(5): 371-374.

LEVINE, J., SWANSON, P.D. (1968): Idiopathic Thrombocytosis - Neurology 18(7): 711-713.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951): Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent - J. Biol. Chem. 193: 265-275.

LÜBCKE, P.; HERRMANN, W. (1982): Auswirkungen von Cimetidin und Ranitidin auf die plasmatische Gerinnungsfähigkeit des Blutes - DMW 107(44): 1671-1674.

LUQUE OTERO, M.; FERNANDEZ PINILLA, C.; BORQUEZ, M.; FERNANDEZ-GRUZ, A. (1981): The effects of Mepindolol and Atenolol on Blood Pressure, Serum Lipids, Plasma Renin Activity and Platelet Aggregation in Normal Subjects and essential Hypertensive Patients - Abstr. 262, 8th Scientific Meeting International Soc. Hypertension, Milan 31st May-3rd June, 1981.

LYONS, R.M.; STANFORD, N.; MAJERUS, P.W. (1975): Thrombin-induced proteinphosphorylation in human platelets - J. Clin. Invest. 56: 924-936.

MALMSTEN, C.; GRANSTROM, E.; SAMUELSSON, B. (1976): Cyclic AMP inhibits synthesis of prostaglandin endoperoxide (PGG₂) in human platelets - Biochem. Biophys. Res. Comm. 68: 569-576.

MARCUS, A.J. (1982): Platelet Aggregation in: Colman, R.W.; Hirsh, J.; Marder, V.J.; Salzman, E.W. (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis - Lippincott Comp., Philadelphia, Toronto 1982: S.380-389.

MARCUS, A.J.; ZUCKER, M.B. (1965): Physiology of Blood Platelets; New York, Grune & Stratton: S.53.

MARX, R. (1980): Beeinflussung der Thrombozytenfunktion - Therapiewoche 30: 4666-4675.

MARKEL, A.; BROOK, J.G.; LEVY, Y.; AVIRAM, M.; YODIM, M. (1983): Increased Platelet Adhesion and Aggregation in Hypertensive Patients: Effect of Atenolol - Br. J. Clin. Pharmac. 16: 663-668.

MATHEW, G. (1978): Clinical Study of the Diuretic Moduretic - Farmakol. Toksikol. (Moscow) 41(6): 701-704.

MEHTA, J.; MEHTA, P.; OSTROWSKI, N. (1983): Influence of propranolol and 4-hydroxypropranolol on platelet aggregation and thromboxane A₂ generation - Clin. Pharmacol. Therapeutics 34(5): 559-564.

MILLS, D.; SMITH, J.B. (1971): The influence on platelet aggregation of drugs that affect the accumulation of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate in rats - Biochem. J. 121: 185-196.

MURPHY, S.; ROSENTHAL, D.S.; WEINFELD, A.; BRIERE, J.; FAGUET, G.B.; KNOSPE, W.H.; LANDAW, S.A.; LASZLO, S.; PISCIOTTA, A.V.; TARTAGLIA, A.; GOLDBERG, S.D.; BERK, P.D.; DONOVAN, P.B.; WAS-SERMAN, L.R. (1982): Essential thrombocythemia: response during first year of therapy with melphalan and radioactive phosphorus: a Polycythemia Vera Study Group report - Cancer Treatment Reports 66(7): 1495-1500.

MURPHY, S. (1983): Thrombocytosis and Thrombocythaemia - Clinics in Hematology 12(1): 89-106.

MURPHY,S.; ILAND,H.; ROSENTHAL,D.; LASZLO,J.(1986): Essential Thrombocythemia: An Interim Report from the Polycythemia Study Group - Seminars in Hematology 23(3): 177-182.

O'BRIEN,J.R.(1964): Variability in the Aggregation of Human Platelets by Adrenaline - Nature 202: 1188-1190.

O'BRIEN,J.R.; OXON,D.M.(1968): Effects of Salicylates on Human Platelets - Lancet(1): 779-783.

OKUMA,M.; UCHINO,H.(1979): Altered Arachidonate Metabolism by Platelets in Patients with Myeloproliferative Disorders - Blood 54(6): 1258-1271.

ONODA,J.M.; SLOANE,B.F.; HONN,K.V.(1984): Antithrombotic Effects of Calcium Channel Blockers: Synergism with Prostacyclin and Thromboxane Synthase Inhibitors - Thromb. Res. 34: 367-378.

O'REGAN,S.; RIVARD,G.E.; MOUGEAN,J.G.; ROBITAILLE,P.D.(1979): A circulating inhibitor of platelet aggregation in Bartter's Syndrome - Pediatrics 64(6): 939-941.

OTT,E.; LECHNER,H.; FAZEKAS,F.(1983): Hemorrheological effects of pentoxifylline on disturbed flow insufficiency - Eur. Neurol. 22, Suppl. 1: 105-107.

PARETI,F.J.; GUGLIOTTA,L.; MANNUCCI,L.; GUARINI,A.(1982): Biochemical and Metabolical Aspects of Platelet Dysfunction in Chronic Myeloproliferative Disorders - Thromb. Haemostas. 47(29): 84-89.

PEERSCHKE,E.J.(1982): Induction of Human Platelet Fibrinogen Receptors by Epinephrine in the Absence of Released ADP - Blood 60: 71-77.

PERRET,B.; LEVY-TOLEDANO,S.; PLANTAVID,M.; BREDOUX,R.; CHAP, H.; TOBELEM,G.; DOUSTE-BLAZY,L.; CAEN,J.P. (1983): Abnormal Phospholipid Organization in Bernard-Soulier Platelets - Thromb. Res. 31(4): 5298-537.

PHILIPPS,D.R.; JENNINGS,L.K.; EDWARDS,H.H.(1980): Identification of Membrane Proteins Mediating the Interaction of Human Platelets - J. Cell Biol. 86: 77-86.

PILLA,G.; CIAPONI,A.; MIGLIAVACCA,A.; BONORA,C.(1983): Chronic senile cerebrovascular insufficiency. Effects of sulocitidil and pentoxifylline on erythrocyte deformability - Ric. Clin. Lab. 13, Suppl. 3: 459-464.

POLSTER,P.; BROEKHUYSEN,J.(1976): The adrenergic antagonism of amiodarone - Biochem. Pharmacol. 25: 131-134.

PRESTON,F.E.; EMANUEL,I.G.; WINFIELD,D.A.; MALIA,R.G.(1974): Essential Thrombocythemia and Peripheral Gangrene - Br. Med. J. 3: 548-552.

PRESTON,F.E.(1982): Essential thrombocythaemia - Lancet 1: 1021.

RANE,A.; OELZ,O.; FROLICH,J.C.; SEYBERTH,H.W.; SWEETMAN,B.; WATSON J.; WILKINSON,G.R.; OATES,J.A.(1978): Relation between plasmaconcentration of indomethacin and its effect on prostaglandin synthesis and platelet aggregation in man - Clin. Pharmacol. Ther. 23(6): 658-668.

RAO,A.K.; WALSH,R.N.(1983): Acquired qualitative platelet disorders - Clinics in Hematology 12: 201-238.

REID,C.D.; LEWIS,J.; CHANARIN,J.(1982): Formes Frustes in Myeloproliferative Disorders - Lancet(1): 14-16.

ROSENBLOOM,D.; GILBERT,R.(1981): Reversible Flu-like Syndrome, Leukopenia and Thrombocytopenia Induced by Allopurinol - Drug Intelligence and Clinical Pharmacy 15: 286-287.

RUBEGNI,M.; PROVVEDI,D.; BENVENUTI,C.(1983): The Mechanism of the Inhibitory Effect on Platelet Aggregation of Naftidrofuryl, Lidocaine and Mexiletine - Drug Exp. Cl. 9(2): 187-192.

SALZMAN,E.W.; LEVINE,L.(1971): Cyclic 3'5'-adenosine monophosphate in Human Blood Platelets. Effect of N⁶-2-O-dibutyl-cyclic 3'5'-adenosine monophosphate in platelet function - J. Clin. Invest 50: 131-141.

SCHAFER,A.J.(1982): Deficiency of Platelet Lipoxxygenase Activity in Myeloproliferative Disorders - N. Engl. J. Med. 306: 381-386.

SCHAFER,A.J.(1984): Bleeding and Thrombosis in the Myeloproliferative Disorders - Blood 64: 1-12.

SCHARRER,I.(1985): Methoden zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik - Hämostaseologie 5: 8-16.

SCHNEIDER,W.; SCHARF,R.E.(1985): Erworbene Thrombozytenfunktionsstörungen - Hämostaseologie 5: 32-41.

SCHULZ,V.(1984): Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Beta-Blocker - Fortschritte der Medizin 47: 1203-1205.

SEUTER,F.; PERZBORN,E.(1984): Inhibition of Thromboxane Formation and Platelet Aggregation in vitro and in vivo by Nifedipine - Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 325 (Suppl.): R45 Abstr. 179.

SHAHIDI, N.T.; DIAMOND, L.K. (1961): Testosterone-induced Remission in Aplastic Anemia of Both Acquired and Congenital Types - N. Engl. J. Med. 264: 954-967.

SHATTIL, S.J.; ANOYA-GALINDO, R.; BENNETT, J.; COLMAN, R.W.; COOPER, R.A. (1975): Platelet Hypersensitivity Induced by Cholesterol Incorporation - J. Clin. Invest. 55: 636-643.

SIEGL, A.M.; SMITH, J.B.; SILVER, M.J.; NICOLAOU, K.C.; AHORN, D. (1979): Selective Binding -Site for Prostacyclin H_3 on Platelets - J. Clin. Invest. 63(2): 215-220.

SILVERSTEIN, M.N. (1968): Primary or hemorrhagic thrombocythemia - Archives of Internal Medicine 122: 18-22.

SILVERSTEIN, M.N. (1977): Myeloproliferative Diseases - Postgrad. Med. 61(2): 206-210.

SILVERSTEIN, M.N. (1983): Primary Thrombocythemia in: William, J. W. (Hrsg.): Hematology, 3. Aufl., New York 1983: S.218-221.

SINGH, A.K.; WETHERLEY-MEIN, G. (1977): Microvascular occlusive lesions in primary thrombocythaemia - British Journal of Haematology 36: 553-564.

SKAER, R.J. (1981): Platelet degranulation - in: Platelets in Biology and Pathology 2, Editor: Gordon, J.L.; p.321-348. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

SNYDER, ST.; COODLEY, E.L. (1976): Inhibition of Platelet Aggregation by Alpha₁-Acid Glycoprotein - Arch. Intern. Med. 136: 778-781.

STADNICKI, A. (1984): Ranitidine and Hemostasis in Man - Hepatogastroenterol. 31: 230-232.

STEEN,M.; HOLMSEN,H.(1984): Inhibition of ADP-induced Responses in Human Platelets by Agents Elevating the cAMP-Level: Comparison of Aggregation and Shape Change - Thromb. Haemostas. 52(3): 330-335.

TANGEN,O.; MC KINNON,E.L.; BERMAN,H.J.(1973): On the fine structure and aggregation requirements of gel filtered platelets - Scand. J. Haematol. 10: 96-102.

TATESON,J.E.; MONCADA,S.; VANE,J.R.(1977): Effects of Prostacyclin on Cyclic AMP Concentrations in Human Platelets - Prostaglandins 13(3): 389-397.

TSIEN,W-H.; SASS,S.P.; SHEPPARD,M.(1982): The Lack of Correlation between Inhibition of aggregation and cAMP-Levels with Canine Platelets - Thromb. Res. 28: 509-519.

VALLE,D.; CASADEVALL,N.; LACOMBE,C.; VARET,B.; GOLDWASSER,E. FRANCO,D.; MAILLARD,J.N.; PARIENTE,A.; LEPORRIER,M.; RUEFF, B.; MULLER,O.;BENHAMOU,J.P. (1985): Primary myeloproliferative disorder and hepatic vein thrombosis. A prospective study of erythroid colony formation in vitro in 20 patients with Budd-Chiari syndrome - Ann. Intern. Med. 103: 320-324.

VERMYLEN,J.; BADENHORST,P.N.; DECKMYN,H.; ARNOUT,J.(1983): Normal Mechanisms of Platelet Function-Clinics in Hematology 12: 107-151.

VIRMANI,R.; POPOVSKY,M.A.; ROBERTS,W.C.(1979): Thrombocytosis, coronary thrombosis and acute myocardial infarction - American Journal of Medicine 67: 498-506.

VREEKEN,J.; VAN AKEN,W.G.(1971): Spontaneous Aggregation of Blood Platelets as a Cause of Idiopathic Thrombosis and Recurrent Painful Toes and Fingers - Lancet(2): 1394-1397.

VOSS,D.; FUCHS,G.; SCHNEIDER,D.; SCHNEIDER,J.(1972): Der Einfluß des oralen Antidiabetikums Glibornurid auf Blutgerinnung, Thrombozyten und Fibrinolyse - *Arzneim. Forsch.* 22 (12a): 2219-2221.

WARE,J.A.; SCHWARTZ,J.B.; HORAK,J.K.; SOHLS,R.T.(1985): Inhibition of Platelet Aggregation by Oral Digoxin and Reversal with Nifedipine - *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7(2): 262-266.

WEBER,W.; OBRECHT,P.J.(1983): Etretnate,Lamustine and Bleomycin versus Lamustine and Bleomycin in Advanced Squamous Cell Lung Carcinoma - *Cancer Treatment Reports* 67(9): 847-849.

WEISS,H.J.(1975): Platelet physiology and abnormalities of platelet function - *N. Engl. J. Med.* 293: 531-541.

WEITHMANN,K.U.(1981): Drug stimulated prostacyclin release - *Ric. Clin. Lab.* 11, Suppl.: 209-214.

WU,K.K.(1978): Platelet Hyperaggregability and Thrombosis in Patients with Thrombocythemia - *Ann. Intern. Med.* 88: 7-11.

YAMAMOTO,K.; SEKIGUCHI,E.; TAKATANI,O.(1984): Abnormalities of Epinephrine-Induced Platelet Aggregation and Adenine Nucleotides in Myeloproliferative Disorders - *Thromb. Haemostas.* 52(3): 292-296.

ZUCKER,M.B.; NACHMIAS,V.T.(1985): Platelet Activation - *Arteriosclerosis* 5: 2-18.

ZURRO,J.; ROMERO,H.; MARANON,A.; DURAN,S.; ROMERO,E.(1975): Platelet Aggregation in Diabetic Patients Treated with Oral Hypoglycemic Agents - *Diabetologia* 11(4): 372-373.

Teile der Arbeit sind veröffentlicht, bzw. zur Veröffentlichung vorgesehen in:

JAHN,M.; BAUMANN,B.; PIECHOWIAK,H.; HILLMAR,I.; HEHLMANN,R.
(1986): Essential thrombocythemia: platelet function tests
and clinical characteristics - Blut 53:235.

HEHLMANN,R.; JAHN,M.; BAUMANN,B.; HILLMAR,I.; KÖPCKE,W.
(1987): Untersuchungen zur Diagnose und Differentialdiagnose
der essentiellen Thrombozythämie - Klin. Wochenschr. 65
(Suppl IX): 185-186.

HEHLMANN,R.; JAHN,M.; BAUMANN,B.; HILLMAR,I.; KÖPCKE,W.
(1988): Essential Thrombocythemia: Clinical Characteristics
and Course of 57 Cases - Cancer, zur Veröffentlichung ange-
nommen.

BAUMANN,B.; HILLMAR,I.; HEHLMANN,R. (1988): Zur Thrombozyten
funktion bei essentieller Thrombozythämie und reaktiver
Thrombozytose - Klin. Wochenschr., zur Veröffentlichung
angenommen.

Lebenslauf

18.9.1960	Geburt in Tübingen als Tochter des Prof.Dr.Max Baumann und dessen Ehefrau Eleonore, geb. Ohnmacht
1966-1970	Besuch der Grundschule in Tübingen
1970-1979	Besuch des altsprachlichen Uhland-Gymnasiums, Tübingen
22.5.1979	Abitur
1979 - 1982	Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
März 1982	Ärztliche Vorprüfung
1982 - 1986	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
März 1983	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1986	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1986 - März 1987	Praktisches Jahr am Städtischen Krankenhaus Stuttgart - Bad Cannstatt (Akademisches Lehrkrankenhaus der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen)
Mai 1987	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
18.5.1987	Approbation als Ärztin

